

Frühkindliche Netzhautdegeneration  
Kopplungsanalyse und Kandidatengenansatz auf  
Chromosom 1 zur Identifikation des ursächlichen Gens in  
einer konsanguinen Familie mit frühkindlicher  
Netzhautdegeneration

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des  
Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Hausotter-Will, Nora Geraldine, geb. Hausotter  
aus Friedberg

Gießen 2015

Aus dem Labor für Molekulare Ophthalmologie  
an der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Direktorin der Klinik: Prof. Dr. med. Birgit Lorenz

Gutachter:PD Dr. M. Preising

Gutachter:Prof. Dr. M. Müller

Tag der Disputation: 25.11.2015

**Inhaltsverzeichnis:**

**1. Einleitung**

- 1.1 Anatomie des Auges
- 1.2 Aufbau der Photorezeptoren
- 1.3 Phototransduktion-Sehkaskade und Retinolrecycling
- 1.4 Frühkindliche Netzhautdystrophien
  - 1.4.1 Definition der Frühkindlichen Netzhautdystrophien
  - 1.4.2 Klinik und Diagnostik der Frühkindlichen Netzhautdystrophien (LCA/EOSRD)
  - 1.4.3 Genetischer Hintergrund der Frühkindlichen Netzhautdystrophien (LCA/EOSRD)
  - 1.4.4 Therapieoptionen der Frühkindlichen Netzhautdystrophien (LCA/EOSRD)
- 1.5 Grundlagen der Erbinformation
  - 1.5.1 Das Genom
  - 1.5.2 Mutationen
  - 1.5.3 Polymorphismen
  - 1.5.4 Mikrosatelitenmarker (STR)
- 1.6 Aufgabenstellung

**2. Material und Methoden**

- 2.1 Materialnachweis
- 2.2 Verbrauchsmaterial
- 2.3 Gerätenachweis
- 2.4 Primer für Mikrosatelliten-PCR
- 2.5 Patientenkollektiv
- 2.6 Isolation von DNA (Desoxyribonukleinsäure) aus Vollblut
- 2.7 Mikro-Array
- 2.8 Kopplungsanalysen
- 2.9 Kopplungsanalyse mit MERLIN
- 2.10 Identifikation geeigneter Mikrosatellitenmarker (Primer)
- 2.11 Grundprinzipien und Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
- 2.12 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarose-Gelelektrophoresen
- 2.13 Kapillarelektrophorese mit der QIAxcel

**3. Ergebnisse**

- 3.1 Patientenkollektiv und Vorscreening
- 3.2 Klinische Untersuchungen

- 3.3 Kopplungsanalysen mittels SNP-Mikro-Array
- 3.4 Eingrenzung der Kandidatenregion mittels Mikrosatellitenmarkern
- 3.5 Kopplungsanalyse mit MERLIN
- 3.6 Sequenzierung von *RD3*

#### **4. Diskussion**

- 4.1 Bewertung der Kopplungsanalyse und anderer verwendeter Methoden in der vorliegenden Arbeit
- 4.2 Das *RD3*-Gen
- 4.3 Tiermodelle
  - 4.3.1 Natürliche Tiermodelle – die rd3 Maus
  - 4.3.2 Natürliche Tiermodelle – das Hundemodell: rcd2 Collie (Rod-cone dysplasia type 2)
- 4.4 Humane *RD3* Mutationen
- 4.5 Physiologie des RD3-Proteins
- 4.6 Pathophysiologie des RD3-Proteins
- 4.7 Phänotypische Ausprägungen der humanen *RD3* Mutation
- 4.8 Phänotypischer Vergleich von *RD3* und *GUCY2D* bedingter frühkindlicher Netzhautdegeneration
- 4.9 Mögliche Therapieoptionen bei LCA 12 (*RD3* Mutation)
- 4.10 Ausblick

#### **5. Zusammenfassung**

- 5.1 Zusammenfassung
- 5.2 Summary

#### **6. Abbildungsverzeichnis**

#### **7. Tabellenverzeichnis**

#### **8. Abkürzungsverzeichnis**

#### **9. Literaturverzeichnis**

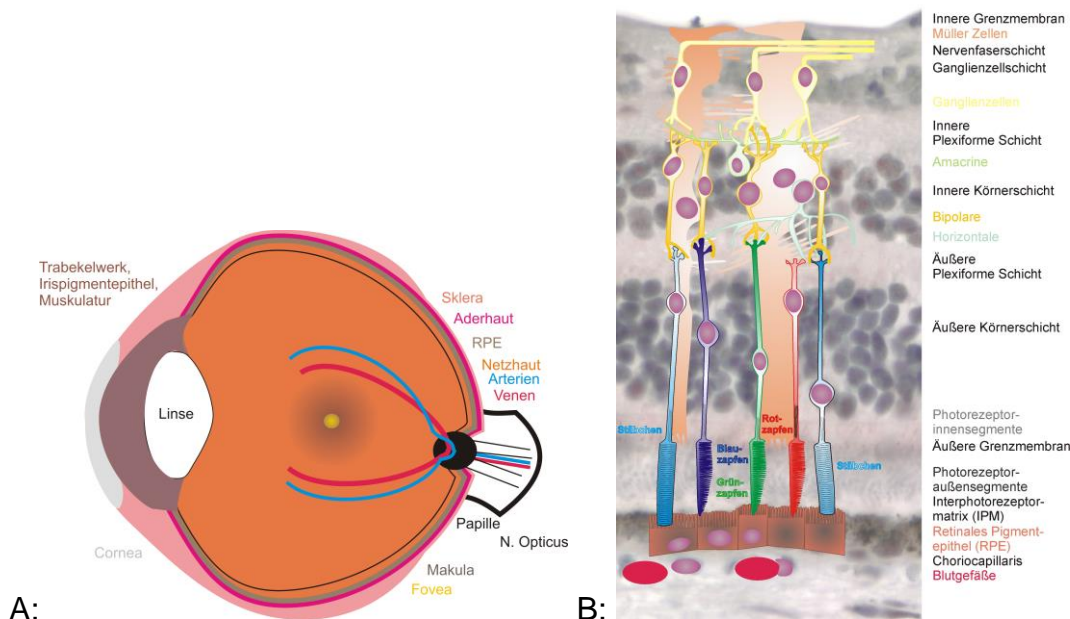
#### **10. Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation**

#### **11. Danksagung**

## 1. Einleitung

### 1.1 Anatomie des Auges

Die innerste Schicht des Augapfels bildet die Retina (Netzhaut), welche für die sensorische Funktion des Auges zuständig ist (Abb. 1). Ihr aufgelagert ist das retinale Pigmentepithel (RPE), das die Versorgung der Retina sicherstellt [121,123].



**Abbildung 1: Aufbau des Auges**

A: Schematische Übersicht über den Augapfel

B: Aufbau der Retina und der angrenzenden Zellschichten (mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Preising)

Die Retina kleidet die Bulbuswand von innen aus. Ausgespart bleibt lediglich die Stelle an der der N. opticus den Bulbus verlässt (Papilla n. optici) [121,123].

Die Retina setzt sich von innen nach außen aus folgenden Schichten zusammen. Zu Beginn befindet sich die innere Grenzmembran (Abb.1B), bestehend aus der Basallamina und den Endfüßchen der Gliazellfortsätze sowie den Zellkernen der Müller- Zellen. Es folgt die Nervenfaserschicht bestehend aus den Neuriten der Ganglienzellen, gefolgt von der Ganglienzellschicht, in der die Kerne der Ganglienzellen (3. Neuron) liegen. Daran schließt sich die innere plexiforme Schicht an, in der die Synapsen zwischen den Axonen des 2. Neuron (Bipolarzellen) und den Dendriten des 3. Neuron (Gliazellen) liegen, ebenso wie die Zellkerne der Amakrinen-Zellen. Diese wird gefolgt von der inneren Körnerschicht, in der sich die Kerne der

## 1. Einleitung

Horizontalzellen und der Bipolarzellen (2. Neuron) befinden. Im Anschluss folgt die äußere plexiforme Schicht, in der die Synapsen zwischen den Axonen des 1. Neuron und den Dendriten des 2. Neuron liegen. Daran schließt sich die äußere Körnerschicht an, in der die Kerne der Photorezeptorzellen (Stäbchen und Zapfen, 1. Neuron), also die Innensegmente, liegen. Im Anschluss folgt die äußere Grenzschiicht, welche die Außensegmente der Photorezeptorzellen beinhaltet [1]. An die Photorezeptorzellen schließt sich das retinale Pigmentepithel an. Dieses bildet eine einzellige Schicht, deren Aufgabe darin besteht, den Stoffaustausch zwischen Photorezeptorzellen und Choroideakapilaren zu vermitteln (Versorgung der Retina mit notwendigen Nährstoffen und Abtransport von Stoffwechselabbauprodukten) [123].

In der Retina befinden sich 6 Millionen Zapfen und etwa 120 Millionen Stäbchen, die jedoch nicht gleichmäßig verteilt sind [121]. In der Fovea centralis liegen ausschließlich Zapfen, deren Dichte in der Peripherie abnimmt, wohingegen sich die größte Dichte der Stäbchen (Absorptionsmaximum 500 nm [126]) bei ca. 30° rund um die Fovea centralis befindet und ebenfalls zur Peripherie hin kontinuierlich abnimmt [121,123]. Die Stäbchen sind auf Grund ihrer höheren Lichtsensitivität für das kontrastreiche Schwarz-Weiß-Sehen im Dunklen verantwortlich. Die Zapfen dienen dem lichtintensiven Farbsehen und lassen sich in drei Gruppen mit unterschiedlichen Absorptionsmaxima (kurzwelliges blaues Licht (S-cones) 420 nm, mittelwelliges blaugrünes bis gelbes Licht (M-cones) 535 nm, langwelliges rotes Licht (L-cones) 565 nm) unterteilen [121,123].

### **1.2 Aufbau der Photorezeptoren**

Die Photorezeptorzellen lassen sich in drei verschiedene Bereiche unterteilen: das Axon (Kontakt zum 2. Neuron, Impulsweiterleitung), das Perikarion, oder Innensegment (metabolisches Zentrum und Ort der Proteinbiosynthese) und das Außensegment (lichtsensitiver Teil, Ort der Phototransduktion) [151]. In der Plasmamembran des zylinderförmigen Außensegmentes der Photorezeptorzellen liegen Stapel aus 600 - 1000 flachen Scheiben (Disk) des Sehpigmentes Rhodopsin [151]. Die Außensegmente der Photorezeptorzellen werden in regelmäßigen Abständen erneuert (Stäbchen: komplette Erneuerung innerhalb von 10 Tagen) und wachsen von proximal aus nach [151]. Ein Teil der an der Phototransduktion beteiligten Enzyme ist an die Photorezeptorzellmembran der Außensegmente gebunden, während andere gelöst im Zytoplasma der Photorezeptorzelle vorliegen [60].

Die im Innensegment gebildeten Proteine werden über intraflagellaren Transport (IFT) bis an ihren Wirkort gebracht. Das Innen- und Außensegment der Photorezeptorzellen ist durch ein modifiziertes nicht-motiles Verbindungszilium, welches die einzige

zytoplasmatische Verbindung darstellt, verbunden [2]. Die Proteine werden in Partikeln zwischen der Membran und dem äußeren Mikrotubuliring transportiert. Der molekulare Motor Kinesin II ist für den Transport der IFT-Partikel zum Plus-Ende der Mikrotubuli (Richtung Außensegment) und Dynein für den Rücktransport zum Minus-Ende der Mikrotubuli (Richtung Innensegment) verantwortlich [2].

### **1.3 Phototransduktion - Sehkaskade und Retinolrecycling**

In den Außensegmenten der Photorezeptorzellen befinden sich Opsinmoleküle, die mit 11-cis-Retinal beladen sind. Durch die Absorption von Photonen tritt eine Isomerisierung des Chromophors vom instabilen 11-cis-Retinal zum stabilen all-trans-Retinal ein und führt zu einer Konformationsänderung des Opsinmoleküls. Dadurch wird der Sehprozess in Gang gesetzt [50].

Durch diese Konformationsänderung bindet das aktivierte Opsin an ein heterotrimeres G-Protein, das Transducin, das die Aktivierung auf eine membranassoziierte Phosphodiesterase (PDE6) überträgt [17, 45, 47, 61, 149]. Die aktivierte Phosphodiesterase hydrolysiert mit hoher Geschwindigkeit, ca. 2000 freie cGMP Moleküle pro Sekunde zu GMP [41, 74, 75].

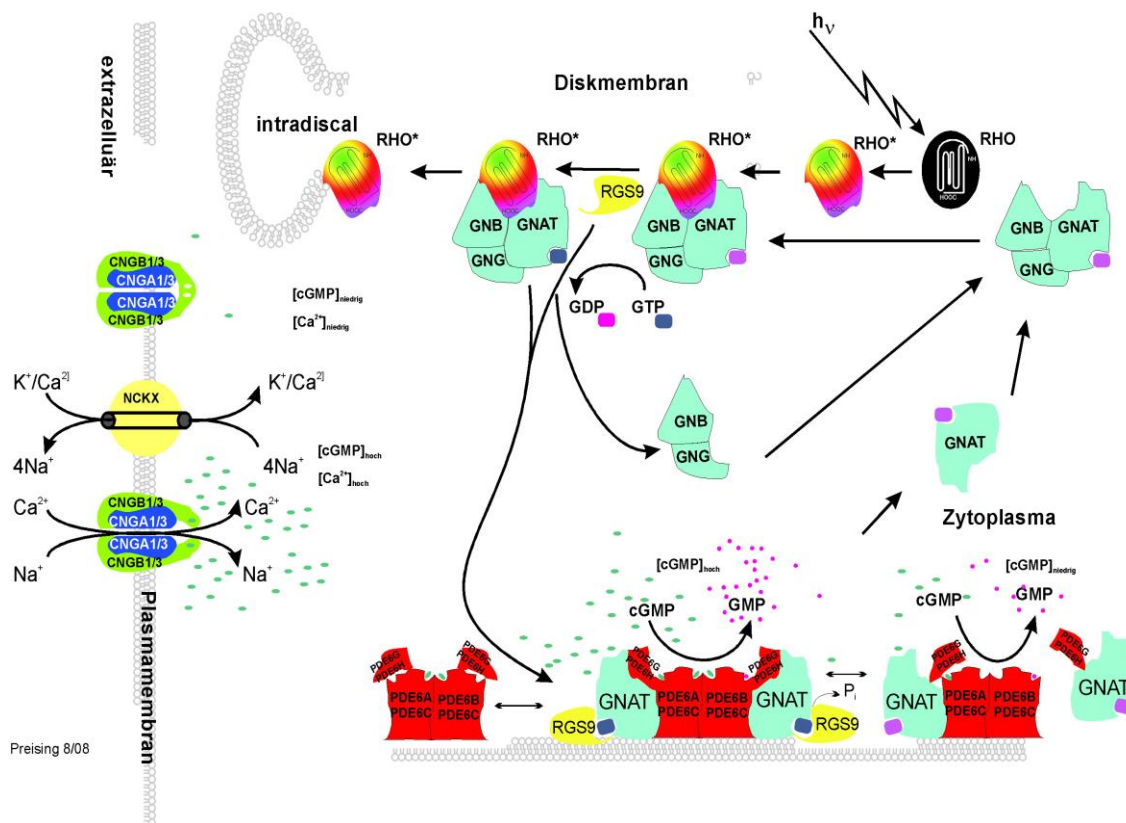
Die Abnahme des freien cGMP-Spiegels im Zytoplasma des Außensegments führt bei den Ionenkanälen (Natrium-Kalzium-Kanäle), welche durch cGMP im Dunklen offen gehalten werden (ca. -40 mV (sogenannter Dunkelstrom [14,15])), zur Abnahme des Kationen-Einwärtsstroms. Es kommt somit zu einer Verstärkung der negativen Ladung im Zellinneren (Hyperpolarisation auf -70mV) [16,150]. Die Hyperpolarisation bewirkt ein elektrisches Signal das bis zur Synapse fortgeleitet wird und zu einer Hemmung der Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat am Fuße der Photorezeptorzelle führt. In den nachgeschalteten Bipolarzellen kommt es somit zu Potentialänderungen, und damit zur Erzeugung eines Nervenimpulses.

Die abfallende Kalzium-Konzentration führt außerdem zu einer Aktivierung des Guanylatzyklase-aktivierenden Enzyms (kalziumabhängig), sodass der cGMP-Spiegel durch die nun aktive Guanylatzyklase wieder aufgebaut wird. Es entsteht also zunächst ein Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau des cGMP. Kurze Zeit nach Reizabschluss wird das Opsin wieder inaktiviert und die Sehkaskade wird beendet.

Die weiterhin aktive Guanylatzyklase synthetisiert weiterhin cGMP, sodass dessen Konzentration wieder ansteigt, wodurch die cGMP-abhängigen Kationentransporter ebenfalls ihre Aktivität steigern und die Kalziumkonzentration im Zellinneren erneut ansteigt und somit indirekt die Guanylatzyklaseaktivität vermindert wird. Aufgrund der Regeneration des cGMP-Spiegels ist das System wieder bereit für einen erneuten Reiz [16,17,45,47,149,150].

## 1. Einleitung

Der gebleichte Chromophor all-trans-Retinal wird im RPE über mehrere Schritte im Retinolzyklus zu 11-cis-Retinal regeneriert. Die zentralen Enzyme des Retinolzyklus sind die Lecithin-Retinol-Acyltransferase (LRAT), welche all-trans-Retinyester produziert und die Isomerohydrolase (RPE65), welcher die all-trans-Retinyester als Substrat dienen. Dabei liefert die Spaltung der Esterbindung die notwendige Energie für die Isomerisierung [71].



**Abbildung 2: Phototransduktion** (aus Retina International Scientific Newsletter)

CNCG1 / CNCG2 = cGMP-gesteuerter Kationen-Kanal Untereinheit 1/2, cGMP = zyklisches Guanosinmonophosphat, GDP = Guanosindiphosphat, GTP = Guanosintriphosphat, GNAT / GNB / GNG = G-Protein Transducin ( $\alpha$ -/  $\beta$ -/  $\gamma$ -Untereinheit), NCKX =  $Na^+/Ca^{2+}/K^+$ -Austauscher, PDEA / PDEB / PDEG = Phosphodiesterase 6 ( $\alpha$ -/  $\beta$ -/  $\gamma$ -Untereinheit),  $P_i$  = anorganisches Phosphat, RGS9 = Guanylatzyklase aktivierendes Protein), RHO = Rhodopsin (mit 11-cis-Retinal), RHO\* = aktiviertes Rhodopsin (mit all-trans-Retinal)



## **1.4 Frühkindlichen Netzhautdystrophien**

### **1.4.1 Definition der Frühkindlichen Netzhautdystrophien**

Unter dem Begriff Frühkindliche Netzhautdystrophie ist eine sehr heterogene Gruppe von Erkrankungen zusammengefasst, welche die verschiedensten Zellarten der Retina betreffen [118], <http://www.retina-international.org/sci-news/disloci.htm> .

Netzhautdystrophien gehören zu den häufigsten erblich bedingten Augenerkrankungen, deren Anteil je nach Land und Autor zwischen 20% und 80% variiert [48,90,119].

Es besteht keine einheitliche und allgemeingültige Nomenklatur. Die Einteilung erfolgt nach unterschiedlichsten Gesichtspunkten (Histologie, Genetik, Augenhintergrundveränderungen, etc.) [70] und beinhaltet verschiedene Zapfen-Stäbchen-Dystrophien und Stäbchen-Zapfen-Dystrophien [118].

Bei Zapfen-Stäbchen-Dystrophien handelt es sich um Erkrankungen, bei denen zunächst die Zapfenfunktion und im Folgenden erst die Stäbchenfunktion eingeschränkt ist oder verloren geht. Bei Stäbchen-Zapfen-Dystrophien verhält es umgekehrt. Ein Ausfall der Stäbchenfunktion ist durch ausgeprägte Nachtblindheit und eine konzentrische Einengung des Gesichtsfeldes charakterisiert, wohingegen bei Verlust der Zapfenfunktion neben einer verminderten Sehschärfe, Farbsehstörungen und erhöhte Lichtempfindlichkeit auffallen [143].

Eine Untergruppe der hereditären frühkindlichen Netzhautdystrophien stellt die EOSRD (early onset severe retinal dystrophy) dar. Die klinischen Befunde variieren von weniger massiven Verläufen bis hin zur hochgradigen Sehstörung bereits in den ersten Lebensmonaten [131].

Letzteres entspricht der klinischen Diagnose Lebersche kongenitale Amaurose (LCA) (Erstbeschreiber war im Jahre 1869 der deutsche Augenarzt Theodor Leber, dem zu Ehren die Erkrankung ihren Namen erhielt [85]), wobei auch die Verwendung dieses Begriffes häufig sehr heterogen genutzt wird. Einige verstehen darunter nur angeborene Blindheit mit einem Ganzfeld-Elektroretinogramm (ERG) unterhalb der Nachweisgrenze bereits im Säuglingsalter, andere verstehen darunter ebenfalls schwere frühkindliche Netzhautdystrophien, bei denen in den ersten Lebensjahren noch ein messbares Sehvermögen vorhanden ist [118]. Die bisher bekannten Unterformen der LCA sind nicht nur phänotypisch sondern auch genotypisch heterogen [118], weshalb es sich anbietet diese nach dem zugrunde liegenden Gendefekt zu unterteilen.

### **1.4.2 Klinik und Diagnostik der Frühkindliche Netzhautdystrophien (LCA/EOSRD)**

Klinisch weisen die betroffenen Patienten mit frühkindlicher Netzhautdystrophie eine

## 1. Einleitung

hochgradige Visusminderung bis hin zur Blindheit (entwickelt sich innerhalb des ersten Lebensjahres oder besteht bereits bei Geburt) auf [9]. Weitere klinische Symptome, welche sich infolge der beträchtlichen Visusminderung entwickeln sind Nystagmus, Photophobie, Strabismus, fehlende Reaktion auf optische Reize bis hin zu träger oder fehlender Pupillenreaktion und okulodigitale Phänomene (Franceschetti-Zeichen (bohren mit den Fingern in den Augenhöhlen)) [9,88,131,143].

Bei der Einordnung des Phänotyps werden zunächst anamnestische Daten wie Erkrankungsalter, zusätzliche Einschränkungen, betroffene Familienangehörige, etc. erhoben, dann erfolgt eine klinische Untersuchung. Dazu gehört die Visusbestimmung, die Fundoskopie, die Perimetrie (Gesichtsfeldmessung, sowohl statisch als auch dynamisch), die Untersuchung des Farbensehens sowie elektrophysiologische Untersuchungen. Während die Fundoskopie gerade im Frühstadium häufig einen relativ unauffälligen Augenhintergrund zeigt, welcher im Verlauf jedoch Pigmentveränderungen, Knochenbälkchen, Gefäßverengungen sowie eine Atrophie der Papille entwickeln kann, [21,118,133,143] liegt das Elektroretinogramm (ERG) häufig bereits zu Beginn unter der Nachweisgrenze [131,143].

Eine Schwierigkeit bei der Einordnung des Phänotyps liegt in der begrenzten Reproduzierbarkeit von Untersuchungen. Gründe hierfür sind z.B. tageszeitliche Schwankungen der Leistungsfähigkeit, aktuelle Verfassung des Patienten (Aufmerksamkeit, Müdigkeit, Kooperationsbereitschaft (zumeist bei Kindern)) und die altersbedingten Veränderungen der optischen Verhältnisse des Auges. Eine zunehmende Automatisierung der Testverfahren minimiert die untersucherbezogenen Störfaktoren [90]. Des Weiteren weisen Patienten mit einer frühkindlichen Netzhautdystrophie, bei denen die Makula betroffen ist, einen starken Nystagmus auf, der orts aufgelöste Untersuchungstechniken erschwert oder unmöglich macht. Auch die häufig vorhandene Blendempfindlichkeit limitiert den Einsatz bildgebender Verfahren aufgrund der oft benötigten hohen Lichtintensität [90].

Zusammenfassend lässt sich nach klinisch ophthalmologischen Untersuchungen (Zweifarbenschwellenperimetrie, Fundusautofluoreszenz, optische Kohärenztomographie) in Kombination mit einer anschließenden molekulargenetischen Untersuchung sagen, dass *GUCY2D*-Mutationen bei unauffälligem Fundus den schwersten Phänotyp verursachen, Patienten mit *RPE65*-Mutationen bei unauffälliger Fundusskopie keine Fundusautofluoreszenz zeigen, *CRB1*-Mutationen im optischen Kohärenztomogramm mit einer Verdickung der Retina einhergehen und *CRX*-Mutationen mit einer progressiven Zapfen-Stäbchen-Dystrophie korrelieren [118]. Einige Patienten zeigen syndromale Formen der frühkindlicher Netzhautdystrophie (z.B. das Bardet-Biedl-Syndrom oder die Spinozerebellären Ataxie Typ 7).

Außerdem gibt es Genmutationen, die je nach Ausprägung zu unterschiedlichen Phänotypen führen können. Ein Beispiel ist das *ABCA4* (=ABCR) Gen, dessen Mutation typischerweise mit dem Morbus Stargardt einhergehen, aber auch zu Zapfen-Stäbchen-Dystrophien oder zur Retinitis pigmentosa führen kann [51].

### **1.4.3 Genetischer Hintergrund der frühkindliche Netzhautdystrophien (LCA/EOSRD)**

Durch molekulargenetische Untersuchungen konnten beim Menschen 23 Gene identifiziert werden, deren Mutationen mit klinischen Symptomen der LCA einhergehen und praktisch alle Bereiche der Photorezeptorfunktion von der Sehkaskade, über den Retinolzyklus bis hin zum intraflagellaren Transport betreffen [89,90,118]

(<http://www.retina-international.org/sci-news/databases/disease-database/leber-congenital-amaurosis/>). Mutationen in diesen 23 Genen sind für etwa 70 % der untersuchten LCA-Fälle verantwortlich. Bei den verbleibenden 30 % der Patienten ist die zu Grunde liegende Mutation noch unbekannt [89,143].

Am häufigsten wurden Mutationen im *CEP290*-Gen (ca. 15 %), *GUCY2D*-Gen (ca. 12 %,) und *CRB1*-Gen (ca. 10 %) nachgewiesen [143].

Die genaue klinische Analyse der Phänotypen und der Vergleich mit bekannten Genmutationen hat gezeigt, dass Genotypen häufig mit einem speziellen Phänotyp assoziiert sind (siehe Tabelle 1) [118].

## 1. Einleitung

LCA-Typ	Erbgang	Mutiertes Gen Genprodukt	Chromosomale Lokalisation	Funktion/ Pathophysiologie / Phänotypische Auffälligkeiten	Referenz
LCA1	ar; ad	<b>GUCY2D</b> Guanylatzyklase 2D	17p13	-beteiligt an der Synthese von cGMP zur Wiederherstellung des dunkeladaptierten Zustands nach Phototransduktion  - Visuseinschränkung - Nystagmus	[114]
LCA2	ar	<b>RPE65</b> Retinal pigment epithelium-specific protein 65 kDa	1p31	- Wiederherstellung des Sehpigmentes 11-cis Retinal  - Einschränkung des Dunkelsehen - Sehschärfe im Hellen unterschiedlich stark beeinträchtigt (abhängig von Mutationsart und Lebensalter)	[55]
LCA3	ar	<b>SPATA7</b> Spermatogenesis associated 7	14q31.3	-Vorkommen im Zytoplasma der Innensegmente  - Nachtblindheit - Verlust von mittel und peripherem Gesichtsfeld.	[144]
LCA4	ar	<b>AIPL1</b> Aryl hydrocarbon receptor interacting protein-like 1	17p31.1	-Chaperon-oder Kerntransportaktivität  - eingeschränkter Visus - Nystagmus	[128]
LCA5	ar	<b>C6orf156</b> C6 Open reading frame 152	6q14	- zentrosomalen oder ziliären Funktion  - Nystagmus - Katarakt	[7]
LCA6	ar	<b>RPGRIP1</b> Retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein	14q11	- kommt in ziliären Strukturen (Zytoskelett) des Innen-und Außensegmentes vor  - reduzierter Visus - Nystagmus	[43,65,152]
LCA7	ad	<b>CRX</b> Cone-rod homeobox	19q13.3	- Regulierung der Photorezeptorzelldifferenzierung  - schwerer Visusverlust - Nystagmus - Pigmentretinopathie	[103,108]
LCA8	ar	<b>CRB1</b> Crumbs homolog 1	1q31-32.1	-Protein der Zellmembran (lokalisiert im Innensegment, zuständig für die Entwicklung der Polarität)	[39]

## 1. Einleitung

				<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nachtblindheit</li> <li>- progressiver Gesichtsfeldverlust</li> <li>- Hyperopie</li> <li>- Nystagmus</li> </ul>	
LCA9	ar	<b>NMNAT1</b> Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 1	1p36.22	- katalysiert die Kondensation von Nicotinamid Mononukleotiden	[72]
LCA10	ar	<b>CEP290</b> Centrosomal protein 290 kDa	12q21.3	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bestandteil von Zentrosom und Zellskelett</li> <li>- Visusverlust</li> <li>- syndromale Formen z.B. Bardet-Biedl-Syndrom (verschiedene Organsysteme betroffen: zentrales Nervensystem, Retina und Nieren)</li> </ul>	[40]
LCA11	ad	<b>IMPDH1</b> Inosine 5'-monophosphat-dehydrogenase 1	8q31.3	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Synthese des Xanthin-monophosphat (XMP) (limitierender Schritt in der de novo Synthese von Guanin)</li> <li>- Nachtblindheit</li> <li>- Verlust von mittel-und peripherem Gesichtsfeld</li> <li>- Nystagmus</li> <li>- träge oder abwesende Pupillenreaktion</li> <li>- Keratokonus</li> </ul>	[22]
LCA12	ar	<b>RD3</b> Retinal degeneration 3	1q32	- hemmt die Aktivität der Guanylatzyklase	[49]
LCA13	ar	<b>RDH12</b> Retinol dehydrogenase 12	14q23.3	<ul style="list-style-type: none"> <li>- retinale Reduktase mit katalytischer Aktivität gegenüber Retinoiden</li> <li>- Nystagmus</li> <li>- träge oder abwesende Pupillenreaktion</li> <li>- Photophobie</li> <li>- Weitsichtigkeit</li> <li>- Keratokonus</li> </ul>	[113]
LCA14	ar	<b>LRAT</b> Lecithin retinol acyltransferase	4q31.3	<ul style="list-style-type: none"> <li>- katalysiert die mikrosomale Veresterung von all-trans-Retinol in all-trans-Retiny-Ester</li> <li>- schwere progressive Nachtblindheit</li> <li>- Gesichtsfeldeinschränkung</li> <li>- verminderter Visus</li> </ul>	[142]
LCA15	ar	<b>TULP1</b>	6p21.3	- spielt eine Rolle bei der neuronalen Entwicklung	[95]

## 1. Einleitung

		Tubby like protein 1			[23,24,53,54,56]
LCA16	ar	<b>KCNJ13</b> Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 13	2q37	- Teil eines einwärts transportierenden Kaliumkanals	[124]
LCA	ar	<b>ALMS1</b> Alstrom syndrome 1	2p13.1	- verursacht Ziliendefekte, in beiden Spindelpolen in der Mitose nachweisbar	[145]
LCA	ar	<b>CABP4</b> Calcium-binding protein 4	11q13.1	- Kalzium bindendes Protein mit synaptischer Funktion - Regulierung des Ca <sup>2+</sup> -Zustrom und der Freisetzung von Neurotransmittern  - Nachtblindheit	[8]
LCA	ar	<b>IQCB1</b> IQ motif containing B1	3q21.1	- GTPase Regulator-Protein - Rolle bei der Zilienfunktion	[145]
LCA	ar	<b>MyoVIIa</b> Myosin VIIa	11q13.5	- Mitglied der Myosinfamilie mit ATP bindender N-terminaler Motordomäne  - Usher-Syndrom: progressive Netzhautdegeneration, Schwerhörigkeit, mangelnde Vestibularisaktivität	[145]
COD4	ar	<b>PDE6C</b> Phosphodiesterase 6C, cGMP-specific, cone, alpha prime	10q24	- inhibitorische Untereinheit der Phosphodiesterase der Zapfen	[141]
MCOPS5	ar	<b>OTX2</b> Orthodenticle homeobox 2	14q22.3	- Transkriptionsfaktor, wichtig bei Gehirn, Schädel- und Sinnesorganentwicklung - beeinflusst die Proliferation und Differenzierung der dopaminergen neuronalen Vorläuferzellen während der Mitose - Fehlbildungen des Zentralnervensystems (Krämpfe, Kleinwuchs, Entwicklungsverzögerung, Hypophysenhormon Mangel, strukturelle Anomalien der Hypophyse)  - Netzhautdystrophie	[64]

**Tabelle 1: In der Literatur beschriebene ursächliche Gene für die Lebersche konghenitale Amaurose (LCA) und frühkindliche schwere Netzhautdegenerationen** (ar: autosomal rezessiv, ad: autosomal dominant)

#### **1.4.4 Therapieoptionen der frühkindlichen Netzhautdystrophien (LCA/EOSRD)**

Zum jetzigen Zeitpunkt besteht noch kein ursachenkorreliertes therapeutisches Konzept für frühkindliche Netzhautdystrophien im klinischen Alltag [131].

Symptomatische Behandlungsansätze bestehen derzeit in Brillen mit Kantenfiltergläsern sowie vergrößernden Sehhilfen. Die Anbindung an eine Selbsthilfegruppe ist ebenso nützlich für die Betroffenen wie eine psychologische Betreuung. Auch eine genetische Beratung hinsichtlich der Vererbung der Erkrankung an die Nachkommen ist von Bedeutung [131].

Zukünftig verspricht die somatische Gentherapie Heilungserfolge. Es existieren inzwischen einige Gentherapie-Studien am Menschen [30-32, 68,69,92, 93, 127,132]. Ein Beispiel hierfür ist die Gentherapie bei Mutationen im *RPE65*-Gen. Der gentherapeutische Ansatz für *RPE65* Mutationen besteht im Transfer einer korrekten Kopie des komplementären DNA Strangs unter Kontrolle des menschlichen *RPE65* Promotors in die betroffenen Zellen. Als Transfervektor des Gens in die Zelle, wird eine rekombinante Variante des adeno-assoziierten Virus (AAV) genutzt, bei dem die Virus DNA durch ein korrektes *RPE65* Gen ersetzt wurde. Der Transfer-Vektor wird subretinal injiziert, infiziert die Zellen des retinalen Pigmentepithels (RPE-Zellen) und stellt mit Hilfe des klonierten Gens ein funktionsfähiges Genprodukt in den RPE-Zellen her. Die Patienten welche im Alter zwischen 17 und 26 Jahren behandelt wurden gaben eine subjektive Verbesserung der Sehfähigkeit und Lichtempfindlichkeit an [11,93]. Die Gentherapie der *RPE65* Mutationen erzielte umso bessere Ergebnisse, je früher sie begonnen wurde [92]. Da die Zellen der Netzhaut nicht regelmäßig erneuert werden und terminal differenziert sind, hängt eine erfolgreiche Gentherapie immer vom Grad der Schädigung der betroffenen Netzhautzellen ab.

### **1.5 Grundlagen der Erbinformation**

#### **1.5.1 Das Genom**

Das Genom bildet die Gesamtheit der genetischen Information in einer Zelle. Das Genom des Menschen verteilt sich auf 46 Chromosomen (einem diploiden Chromosomensatz mit zweimal 23 Chromosomen). Bei den Chromosomen handelt es sich um kondensierte DNA-Riesenmoleküle, welche aus zwei zueinander komplementären Strängen bestehen. Die gegenüberliegenden komplementären Stränge werden durch Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten. Die Wasserstoffbrückenbindungen bestehen jeweils zwischen den Basen Adenin und Thymin und Guanin und Cytosin. Die genetische Information der DNA ist in der variablen Abfolge dieser vier Basen enthalten und besteht aus  $3 \times 10^9$  bp [125].

Nur ein sehr geringer Teil des menschlichen Genoms (1 - 2 %) beinhaltet kodierende Abschnitte. Diese Abschnitte werden als Gene (20.000 – 21.000 Gene) bezeichnet, liegen aneinandergereiht vor und kodieren für Proteine und RNA (Ribonukleinsäure) [136].

### **1.5.2 Mutationen**

Mutationen sind Veränderungen des genetischen Materials in der Quantität oder in der Qualität und vergrößern die genetische Variabilität. Veränderungen eines einzelnen Gens werden als Genmutationen bezeichnet. Genmutationen können einen Verlust der Funktionsfähigkeit eines Gens zur Folge haben, können sich jedoch auch neutral auswirken oder die Aktivität des Genproduktes steigern. Mögliche Veränderungen sind Deletionen, Duplikationen, Inversionen und Translokationen einzelner weniger Basen, wodurch beispielsweise eine Verschiebung des Leserasters (Frameshift-Mutationen), eine Missense-Mutation (Veränderung der Primärstruktur des Proteins und Verlust dessen Funktion) oder das Entstehen eines Stop-Codons (Nonsense-Mutation und dadurch ein unfertiges Protein) resultieren[137].

### **1.5.3 Polymorphismen**

DNA-Sequenzvariationen, die keine Veränderung einer Proteinfunktion hervorrufen, werden als Polymorphismus bezeichnet [138].

Es existieren verschiedene Arten von Sequenzvariationen. Bei der häufigsten Form handelt es sich um die sogenannten Single Nucleotid Polymorphism (SNP), bei denen ein einziges Nukleotid durch eines der drei anderen ersetzt wurde. Sie werden auch als erfolgreiche Punktmutationen bezeichnet [79]. Außerdem gibt es Substitutions-, Deletions- und Insertionspolymorphismen[138].

Es ist davon auszugehen, dass sich auf der DNA alle 200 bis 1000 Basenpaare ein SNP befindet. Die SNPs hängen im Allgemeinen nicht mit Krankheiten zusammen, da nur ca. 1 - 2% des Genoms [19] für Proteine kodiert und sich somit die meisten SNPs außerhalb von kodierenden Sequenzen oder wichtigen regulatorischen Einheiten befinden. Befinden sich SNPs innerhalb der codierenden Sequenzen, sind sie von besonderem Interesse, da diese unter Umständen die biologische Funktion eines Proteins modifizieren und gegebenenfalls eine genetische Erkrankung verursachen können.

SNPs dienen als biologische Marker zur Erstellung von Chromosomenkarten, da sie genetisch stabil sind und innerhalb des Genoms häufig auftreten. Sie besitzen eine definierbare physikalische Position, welche zu bekannten Genen in Bezug gesetzt



werden kann. Die SNPs können also dazu beitragen Gene, welche bestimmte Erkrankungen verursachen, auf dem Genom zu lokalisieren [138].

### **1.5.4 Mikrosatelliten (STR)**

Neben den Polymorphismen sind die Mikrosatelliten auch "short tandem repeats" (STRs) genannt von großer Bedeutung. Sie gehören zu den repetitiven DNA-Sequenzen [138]. Sie bestehen aus monotonen Wiederholungen kurzer Sequenzen von 1 - 6 bp, also Di-, Tri-, Tetra-, Penta-, und Hexanukleotiden [138]. Diese Sequenzen wiederholen sich tandemartig einige dutzend bis zu einigen hundert Mal. Ein STR ist selten länger als 100 – 200 bp [125]. 50.000 – 100.000 solcher STRs sind über das gesamte Genom des Menschen, in relativ regelmäßigen Abständen, verteilt. Sie machen ca. 2% des Genoms aus und eignen sich daher zur genetischen Kartierung von Chromosomen, da sie ihre Umgebung wie Hinweisschilder markieren [125].

Einige STRs sind für das Entstehen von Erkrankungen verantwortlich (Myotonische Dystrophie oder Chorea Huntington) [137].

Häufig handelt es sich bei den STRs um alternierende Purin-/Pyrimidinbasen wie z.B.  $(GC)_n$ ,  $(AT)_n$ ,  $(CA)_n$ . Besonders häufig sind STRs der Form  $(dC-dA)_n \cdot (dT-dG)_n$  (48), welche ca. 0,5% des Genoms ausmachen (116). Die- Tri- und Tetranukleotid-Repeats dagegen sind ideale Marker für Kartierungs- oder Assoziationsstudien, da sie eine eindeutige Lokalisation besitzen und leicht mittels PCR dargestellt werden können (66,109,114).

### **1.6 Aufgabenstellung**

Ziel dieser Arbeit war es, die ursächliche Mutation für frühkindliche Netzhautdystrophie in einer kurdischen konsanguinen Familie (Familie 659), in der fünf Personen erkrankt sind, zu identifizieren. Dies erfolgte mit Hilfe der Kopplungsanalyse und eines Kandidatengenansatzes auf Chromosom 1, nachdem Mutationen in bekannten Genen für frühkindliche Netzhautdegenerationen ausgeschlossen worden waren. Hierfür wurden geeignete Mikrosatellitenmarker aus öffentlich zugänglichen Datenbanken (NCBI) definiert. Die Verfielfältigung der interessanten DNA-Fragmente erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR). Im Anschluss an die PCR erfolgte die genauere Analyse der Mikrosatellitenallele mittels Kapillarelektrophorese. Mit Hilfe der typisierten Mikrosatellitenmarker wurde eine weitere Eingrenzung des Genlocus mittels Kopplungsanalyse mit MERLIN angeschlossen. Die sich anschließende Kandidatengenrecherche führte zur Sequenzierung und Identifikation des

## 1. Einleitung

krankheitsverursachenden Gens. Zum Abschluss erfolgte eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation über die verfügbaren klinischen Daten der Patienten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialnachweis

	Artikelnummer	Hersteller
GoTaq DNA Polymerase (5 u/μl)	6082744330 M500B	Promega GmbH (Mannheim)
dATP (100 mmol)	RO 142	MBI Fermentas, (St. Leon-Rot)
dCTP (100 mmol)	RO 152	
dTTP (100 mmol)	RO 172	
dGTP (100 mmol)	RO 162	
MgCl <sub>2</sub> 25 mmol	A351H (6082744330)	Promega GmbH, (Mannheim)
Borsäure	1.00165.5000	Merck Schuchardt OHG (Hohenbrunn)
TRIS p.a.	U885.2	Carl Roth GmbH & Co-KG (Karlsruhe)
EDTA-Na <sub>2</sub> *2 H <sub>2</sub> O p.a.	8043.2	Carl Roth GmbH & Co-KG (Karlsruhe)
Biozym LE Agarose	870093	Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf)
Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus 0,5 μg/μl, 50μg	#SM0321	MBI Fermentas (St.Leon Rot)
Nucleospin Extract 2 Kit		Macherey-Nagel (Düren)
QX D-N-A Dilution Buffer	42461955	QIAGEN GmbH (Hilden)
QX Separation Buffer	133216871	QIAGEN GmbH (Hilden)
QX Wash Buffer	133217271	QIAGEN GmbH (Hilden)
QX Mineral Oil 50 ml	42783792	QIAGEN GmbH (Hilden)
QX Intensity Calibration Marker	133223108	QIAGEN GmbH (Hilden)
QX Alignment Marker 15bp/500bp	133204691	QIAGEN GmbH (Hilden)
QX D-N-A Size Marker 25-450bp	3241819	QIAGEN GmbH (Hilden)

#### **Tabelle 2: Materialnachweis**

Die verwendeten Chemikalien wurden soweit möglich in p.A. Qualität eingesetzt.

## 2.2 Verbrauchsmaterial

	Artikelnummer	Hersteller
<u>Pipettenspitzen:</u>		
Biozym Spitzen 10µl	720031	Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf)
200 µl Universal Fit Pipette	4844	Corning Incorporated (Schiphol Rijk, Niederlande)
Biozym Spitzen 1000 µl	721020	Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf)
Biozym Spitzen 2500 µl	722501	Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf)
Biozym Kapillarspitzen 200 µl	929011	Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf)
Brandt Pipettenspitzen 5 ml	G-224-2	Brandt (Wertheim)
Tecan Genesis 50 µl	750215	Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf)
Tecan Genesis 200µl	750226	Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf)
<u>Reagiergefäße:</u>		
Biozym PCR Softtube 0,2ml, einzeln	711080	Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf)
Reagiergefäße Micro Tube 0,5ml, einzeln	72.699	Sarstedt (Nümbrecht)
Reagiergefaß Micro Tube 1,5ml, einzeln	72.690.001	Sarstedt (Nümbrecht)
Reagiergefaß SafeSeal Micro Tube, 2ml, einzeln	72.695.500	Sarstedt (Nümbrecht)
Biozym PCR Softstrips 0,2ml, farblos	711070	Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf)
<u>Micropipetten:</u>		
Reference 1 - 10µl		Eppendorf (Hamburg)
Reference 2 - 20µl		Eppendorf (Hamburg)
Reference 10 - 100µl		Eppendorf (Hamburg)
Reference 100 - 1000µl		Eppendorf (Hamburg)
Transferpette S-8; 0,5 - 10µl		Brand (Wertheim)
Transferpette S-12; 0,5 - 10µl		Brand (Wertheim)
Transferpette S-12; 5 - 50µl		Brand (Wertheim)

Transferpette S; 0,5 - 5ml  
Multipipette stream

Brand (Wertheim)  
Eppendorf Reference (Hamburg)

### **Tabelle 3: Verbrauchsmaterial**

#### **2.3 Gerätenachweis**

##### Tecan Pipettierautomat:

Pipettierroboter Freedom Evo 75 2-Kanal	14082320	Tecan GmbH (Crailsheim)
---	----------	-------------------------

##### Zentrifugen:

Sigma Zentrifuge 1-15PK		Sigma Life Sciene (Taufkirchen)
-------------------------	--	---------------------------------

Rotor:	12024-H	
--------	---------	--

Sigma Zentrifuge 4 K 15		Sigma Life Sciene (Taufkirchen)
-------------------------	--	---------------------------------

Rotor:	11150	
--------	-------	--

Zentrifugenbecher:	13350	
--------------------	-------	--

Adapter:	9 x15 ml / 4 x 50 ml	
----------	-------------------------	--

Mikrotiterplattenhalterung	13220	
----------------------------	-------	--

Mini Centrifuge MCF-2360		LMS CO. (LTO Bunkyo-kuy, Tokyo)
--------------------------	--	---------------------------------

##### Waage:

Feinwaage OHAUS Corporation	PA2102	Pine Brook (USA)
-----------------------------	--------	------------------

##### Schüttler:

Magnetrührer RCT classic		IKA®-Werke (Staufen)
--------------------------	--	----------------------

WT 17		Biometra Whatman (Göttingen)
-------	--	------------------------------

LAB Dancer S40	01.627374	VWR (Darmstadt)
----------------	-----------	-----------------

##### PCR-Cycler:

T Professional Basic Gradient		Biometra Whatman (Göttingen)
-------------------------------	--	------------------------------

T Personal		Biometra Whatman (Göttingen)
------------	--	------------------------------

##### Kammer für Agarose Gelelektrophorese:

Compact XS/S		
--------------	--	--

Compact M		Biometra Whatman (Göttingen)
-----------	--	------------------------------

Compact L/XL		Biometra Whatman (Göttingen)
--------------	--	------------------------------

##### Spannungsgeräte für Agarose Gelelektrophorese:

Power Pack P25		Biometra Whatman (Göttingen)
----------------	--	------------------------------

PS 305T		Biometra Whatman (Göttingen)
---------	--	------------------------------

Transilluminator Bio Doc Analyse		Biometra Whatman (Göttingen)
----------------------------------	--	------------------------------

##### Konzentrationsbestimmung:

Bio Photometer 8,5 mm	Eppendorf (Hamburg)
Präzisions Küvette 10 mm x 8,5 mm	105.210-QS Hellma Analytics (Müllheim)
<u>Kapillarelektrophorese</u>	
QIAXcel	QIAGEN GmbH(Hilden)
High Resolution Cartridge	QIAGEN GmbH (Hilden)

**Tabelle 4: Gerätenachweis**

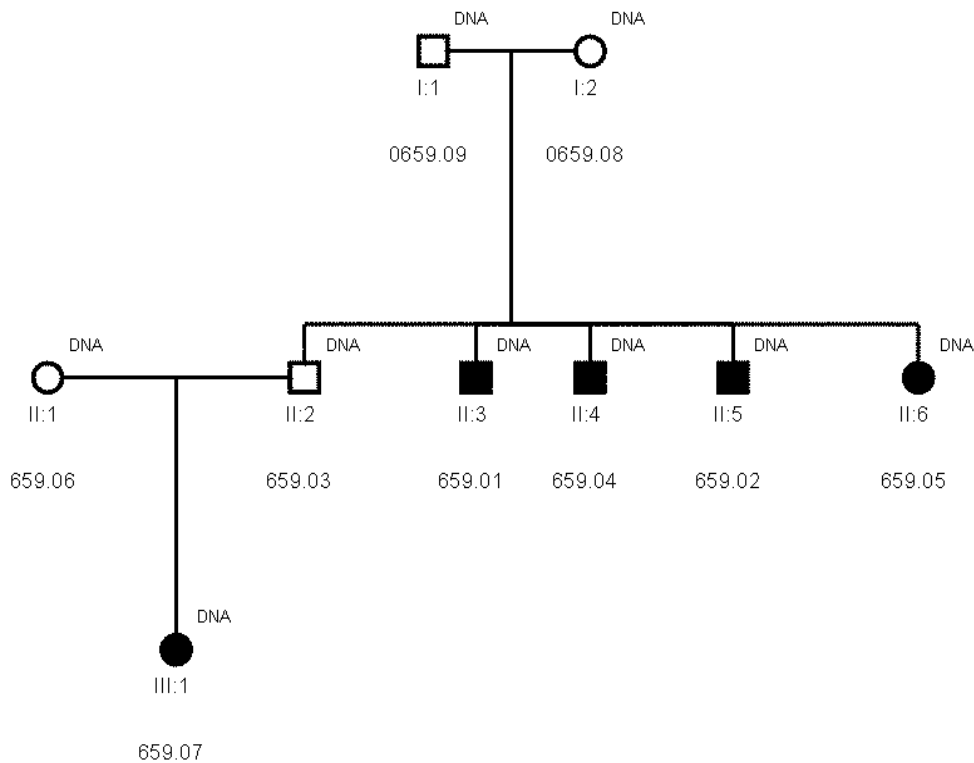
**2.4 Primer für die Mikrosatelliten-PCR**

Name	Database ID	PCR (bp)	Primer forward / Primer reverse	Anealingtemperatur
D1S2127	CHLC.GATA12F10	112-132	TAAGGGAGAAAAAAGCACC / TCTGTTTATTAAGTATCTCTCCAGC	60 °C
D1S1194	UT7705	125	CCTGGCATATAACTGTATCT / TGTATCCTTTAGATTATCCAG	60 °C
D1S2138	CHLC.GATA84H01	237-245	TCTGTTTTGGATAACAATGCC / GGAGTAACAGGCTTCCCCTA	60 °C
D1S1642	CHLC.GATA23B04	248-270	ACTTGCAGTGTAGCTGACACC / TGCCCGTATCTGAAGTACCT	65 °C
D1S1660	CHLC.GATA48B01	226-250	TGCTATCCTCTCACCAGTGA / GTCTGAAGTTCATGGGAACG	60 °C
D1S1647	CHLC.GATA25A11	223-243	CTTGAAGCTTGGAACTTGA / ACCAGCCTCCTACAACCTCT	60 °C
D1S2683	AFMa272xd9	177-189	TGCCTTGTCTTCAAGAGC / GCAGTGACAGGAATCTGG	60 °C
D1S2717	rs3222920	228-270	GTTCAAGACCAGCCTGTG / ATGCTCTAATCTCTCTGGGG	62 °C
D1S249	rs3220605	155-185	TGGCATGTCTTTGAAGGAAT / TGGTTGTAGATGAGACTGGC	60 °C
D1S2727	rs3223018	201-245	TCCTTAAAGCCTCAGTTTCC / GTTGGTGACACCCCTACA	60 °C
D1S2782	rs3223530	274-298	GCTACTCGGGAGGTTGAA / GGGCTTAGAGGTCAGTGTC	62 °C
D1S245	rs3220544	235-253	GACCCCTTTACCTGAGGC / CGCTTTGATAGATTTAGCACTG	60 °C
D1S414	AFM179xg5	185-205	GCACAGTTCAACATCCATT / TCTCTGTCAATTTAGGTCTATTTCT	60 °C
D1S505	rs3222182	145-167	GGAAGGCTTGCTCTTG / CCTCACCCATGACACTG	60 °C
D1S1667	CHLC.GATA63B11	198-218	GATGAATGGATGGATAGCTAGC / CATCGACTGTAGACACAGCG	60 °C
D1S2646	AFMa157tg5	177-211	AGCTTAAATTGAGCAGGAAA / GGAGTAGATCATCACTGGGAG	53 °C
D1S419	rs3220230	162-194	AGCTGGTCCTGTCTGGAT / CGCATGTAAGTTGGGG	58 °C
D1S2857	rs3219705	211-283	TTCAGTGAGCCGAGTTCACACC / ACCGGGCCTCTGTCTCAAAA	65 °C
D1S2629	rs113620824	157-169	TGTCCAACAGCAGATAAGTG / CAATTCATTTCATGTTACTGTCA	60 °C

**Tabelle 5: Primer für Mikrosatelliten-PCR**

### 2.5 Patientenkollektiv

Grundlage dieser Arbeit waren die DNA-Proben einer konsanguinen Familie (659), in der fünf Familienmitglieder an einer frühkindlichen Netzhautdystrophie leiden. Der Stammbaum der Familie erstreckt sich über 7 Generationen und umfasst 97 Personen. Fünf Betroffene und vier weitere Mitgliedern der Kernfamilie, wurden in die Kopplungsanalyse eingeschlossen. Bei den Betroffenen handelt es sich um die Tochter (659.05), drei Söhne (659.01, 659.02, 659.04), und die Enkelin (659.07). (Abb. 3).



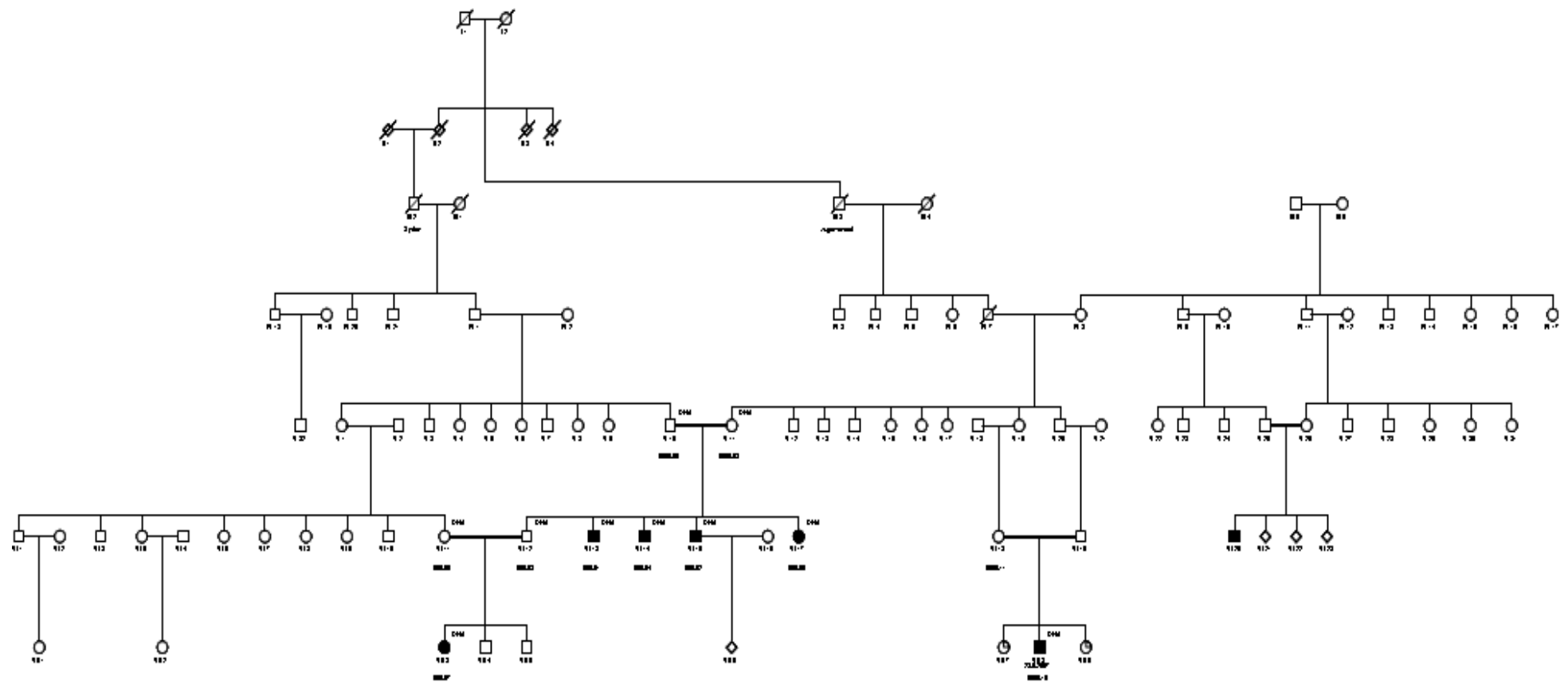
**Abbildung 3: Stammbaum der Kernfamilie 659**

○ Frauen, □ Männer, ausgefüllte Symbole bezeichnen betroffene Individuen, leere Symbole bezeichnen nicht betroffene Individuen

Darüber hinaus wurden zwei ebenfalls betroffene entfernte Verwandte (659.10 und 11) eingeschlossen (Abb 4).

Die Patienten bzw. deren Erziehungsberechtigte wurden im Sinne der Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes über die Studie aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis. Die Studie wurde von den Ethikkommissionen der Universität Regensburg (AZ. 00/106) und der medizinischen Fakultät der Justus-Liebig Universität Gießen (AZ 149/07) befürwortet.

## 2. Material und Methoden



**Abbildung 4: Stammbaum der Familie 659**

○ Frauen, □ Männer, ◇ Geschlecht unbekannt, ausgefüllte Symbole bezeichnen betroffene Individuen, leere Symbole bezeichnen nicht betroffene Individuen, durchgestrichene Symbole bezeichnen verstorbene Individuen, doppelt gezogene Verbindungslinien bezeichnen Konsanguinität



Den Probanden der Kernfamilie (Betroffenen Personen (659.01, 659.02, 659.04, 659.05, 659.07), sowie den phänotypisch unauffälligen Personen (659.08, 659.09, 659.03, 659.06)), wurde, nach erfolgter Aufklärung und Einverständniserklärung im Sinne der Deklaration von Helsinki, 10 ml peripher venöses Blut zur genetischen Untersuchung entnommen. Zur Hemmung der Blutgerinnung enthielten die Blutentnahmeröhrchen EDTA.

Die Studie wurde durch die Ethikkommissionen der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg (00/106) und des Fachbereichs 11 der Justus-Liebig-Universität (147/07) befürwortet.

### **2.6 Isolation von DNA (Desoxyribonukleinsäure) aus Vollblut**

Die Isolation der DNA erfolgte nach dem Protokoll von Miller, Dykes und Polesky. Diese Methode hat den Vorteil, dass auf organische Lösungsmittel verzichtet wird und so der DNA nur ein geringer mechanischer Schaden zugefügt wird. Dadurch können relativ große DNA-Fragmente isoliert werden [97].

#### Lysis Puffer:

155 mM Ammoniumchlorid	41,45 g
10 mM KHCO <sub>3</sub>	35 g
0,1 mM EDTA 2Na	0,185 g
ad 5 l dH <sub>2</sub> O, pH = 7,4	
6 M NaCl	350,64 g/l
0,15 M KCl	11,184 g/l

#### SE-Puffer:

75 mM NaCl	4,39 g
25 mM EDTA 2Na	9,3 g

ad 1 l dH<sub>2</sub>O, pH = 8 mit NaOH konz.

Pronase E (Sigma, Heidelberg Best.Nr.: P6911)

Ansatz zu 10 mg / ml Puffer hinzugeben und 2 h bei 37°C inkubieren. Dann steril filtrieren und zu 1 ml einfrieren (-20 °C)

#### Pronase Puffer:

1 M Tris (pH 7,8)	2 ml
0,5 M EDTA	4 ml
Ad 100 ml dH <sub>2</sub> O	der obigen Mischung 10 ml
10% SDS	1 ml
dH <sub>2</sub> O	9 ml

Pronase E 200 mg portionieren und einfrieren

10 ml des peripher venösen Blutes wurden im Falcon Röhrchen mit 30 ml Lysis-Puffer versetzt ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lyse) und 30 min auf Eis inkubiert. Um die Lyse der Erythrozyten zu verbessern wurde die Suspension alle 5 min. aufgeschwemmt.

Die Suspension wurde 10 min bei 4°C bei 281 g in der Sigma 4K15 Kühlzentrifuge (Rotor: 11150) zentrifugiert und der Überstand wurde dekantiert und abgetropft.

Der Überstand wurde durch 10 ml Lysispuffer ersetzt und das Pellet resuspendiert. Anschließend wurde eine erneute Zentrifugation für 10 min bei 4°C, 281 g in der Sigma 4K15 (Rotor: 11150) durchgeführt.

Durch diese Vorgänge wurde eine Lyse der kernlosen Zellen (Erythrozyten) durchgeführt und die kernhaltigen Zellen, sowie die Lymphozytenmembranen pelletiert. Der Überstand wurde erneut dekantiert und abgetropft und im Anschluss wurde das Pellet mit 10 ml 0,15 M KCl versetzt, um den osmotischen Druck auszugleichen und es zu resuspendieren. Es wurde eine erneute Zentrifugation für 10 min bei 4°C, 281 g in der Sigma 4K15 Kühlzentrifuge (Rotor: 11150) durchgeführt.

Der Überstand wurde ein weiteres Mal dekantiert und das Pellet mit 5 ml SE Puffer, 25 µl Pronase (10 mg / ml) und 250 µl 20%iger SDS versetzt um Proteine und Lipide zu lösen (über 2 Stunden bei 37 °C). Dies führte zur Freisetzung der DNA aus den kernhaltigen Zellen durch Proteolyse.

Der Lösung wurde mit 1,4 ml gesättigter NaCl-Lösung (ca. 6 M) bei Raumtemperatur (25 °C) steril zugegeben, diese wurde 15 sec. auf dem Vortex gemischt, was zur Präzipitation der Proteine führte. Im Anschluss wurde die Suspension 15 min bei Raumtemperatur Sigma 4K15 Kühlzentrifuge (Rotor: 11150) bei 5525 g zentrifugiert.

Der Überstand, in dem sich die DNA befand, wurde in ein neues Falcon Röhrchen überführt. 2 Volumen Ethanol (EtOH) eiskalt wurden bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken zugeben. Dies führte zur Fällung der DNA. Die gefällte DNA wurde bei 5525 g in der Sigma 4K15 Kühlzentrifuge (Rotor: 11150) abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 70%igem EtOH gewaschen.

Die Zentrifugation wurde wiederholt, der Überstand verworfen und dass Pellet an der Luft getrocknet.

Die gewaschene DNA wurde mit 500 µl TE-Puffer (steril) bei Raumtemperatur gelöst. Die Konzentrationen und die Reinheit der Lösung wurden photometrisch bestimmt ( $\text{OD}_{260}$  und  $\text{OD}_{280}$ ).

### **2.7 Mikro-Array**

Unter Array Analyseverfahren versteht man Methoden, bei denen auf eine Hybridisierung des zu untersuchenden Materials (Nukleinsäuren oder Proteine) zurückgegriffen wird [125].

In der modernen Molekularbiologie wurden im Bereich der Hochdurchsatz-Analysen verschiedene Array-Technologien entwickelt.

Zu diesen Untersuchungssystemen gehört auch die Methode der Mikro-Array, welche die parallele Analyse von mehreren tausend Einzelnachweisen in einer geringen Menge biologischen Probenmaterials auf einer sehr kleinen Fläche erlaubt [99]. Die Nukleinsäure-Mikro-Arrays finden Anwendung in der Genomanalyse, der Diagnostik und bei Untersuchungen in der differentiellen Genexpression. Die Nukleinsäure-Mikro-Arrays lassen sich in zwei große Untergruppen aufteilen, die auf unterschiedlichen Prinzipien beruhen. Bei den klassischen DNA-Mikro-Arrays sind einige hundert Basenpaare oder mehr an den Träger gebunden. Bei den Oligonucleotid-Mikro-Arrays, die sich vor allem in der SNP (Single Nucleotide Polymorphism)-Detektion als ideal erwiesen, da mit deren Hilfe viele Variationen in der genomischen DNA parallel detektiert werden können, fungieren kurze, einzelsträngigen DNA-Fragmente zwischen 20-25bp, als Sonden. Diese Sonden bestehen aus einer einzigartigen DNA-Sequenz, in deren Mitte sich der gewünschte SNP befindet. Grundlage für die Mikro-Arrays in der SNP Genotypisierung ist, dass stets nur zwei Basen zueinander komplementär sind (Adenin zu Thymin und Cytosin zu Guanin). Durch die vollständige Sequenzierung der menschlichen DNA (Humangenomprojekt) ist die DNA Sequenz um den gewünschten SNP herum bekannt.

Voraussetzung für diese Technik ist, dass die biologischen Proben mit den DNA-Sonden, welche sich auf dem Träger befinden, hybridisieren [125]. Somit lassen sich Aussagen über die Nukleinsäureprobe, mit der hybridisiert wurde, gewinnen. Durch die große Anzahl und hohe Dichte der auf dem Träger gebundenen Sonden ist eine hohe Anzahl Abfragen, bis zu 250.000.000, auf kleinstem Raum möglich. Die Targets werden mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und lassen sich daher miteinander vergleichen, quantifizieren und digitalisieren [125].

Als Fluoreszenzfarbstoffe werden Fluorochrome (z.B. Cy3 oder Cy5) eingesetzt, die neben einem hohen Auflösungsvermögen zusätzlich den Vorteil haben, dass durch Verwendung unterschiedlicher Fluorochrome gleichzeitig mit einem Array mehrere Target-Pools untersucht werden können, da die unterschiedlichen Fluorochrome spezifische Anregungswellenlängen besitzen und somit unabhängig voneinander quantifiziert werden können [125].

In dieser Arbeit wurde der Gene Chip Human Mapping 50K Array Xba 240 von Affymetrix genutzt, der die Genotypisierung von 50.000 SNPs ermöglicht. Die SNP-Chip-Hybridisierung wurde durch das Max Delbrück Center für Molekulare Medizin in Berlin-Buch durchgeführt.

Die Verarbeitung der Daten des Mikro-Array erfolgte mittels Alohomora (Graphical User Interface), welches die Ergebnisse graphisch darstellt, nachdem die Genotyp Daten in geeignete Formate der Linkage-Programme (z.B. MERLIN) konvertiert wurden [120].

### **2.8 Kopplungsanalysen**

Unter dem Begriff der Genkopplung versteht man, dass Gene, welche sich auf demselben Chromosom befinden, aufgrund ihrer räumlichen Nähe zueinander, während der Meiose, gemeinsam auf die Gameten verteilt werden [125,135]. Die Rekombination zweier Genloci auf homologen Chromosomen ist nur dann möglich, wenn es im Zuge der Meiose zu einem Bruch eines Chromosoms kommt und dieses in der Folge über Kreuz wieder verknüpft wird (crossing-over, "Chiasma"). In diesem Fall kommt es zu einem physikalischen Austausch von Sequenzabschnitten. Je näher die Gene auf einem Chromosom beieinander liegen, desto unwahrscheinlicher ist deren Trennung bei einem Rekombinationsereignis.

Auf dem Boden dieser Theorie hat sich die Methode der Kopplungsanalyse entwickelt. Bei der Kopplungsanalyse müssen grundsätzlich zwei Formen unterschieden werden. Zum einen die parametrische und zum anderen die nichtparametrische Kopplungsanalyse.

Kopplungsanalysen beschäftigen sich mit der Fragestellung, ob eine gemeinsame Vererbung zweier Loci wahrscheinlicher ist als eine unabhängige Vererbung der beiden Loci [98]. Bei den Kopplungsanalysen werden Marker identifiziert, die mit dem genetischen Defekt gekoppelt sind, d.h. auf dem Chromosom in seiner Nähe liegen und folglich mit ihm gemeinsam vererbt werden. Die Bewertung der Kopplungsanalysen erfolgt statistisch in dem man die Wahrscheinlichkeit dafür, dass die Loci gekoppelt sind, zu der Wahrscheinlichkeit, dass sie nicht gekoppelt sind, ins Verhältnis setzt.

Die Entfernung zweier Genloci kann einerseits als physikalische Entfernung durch die Anzahl der dazwischen liegenden Basenpaare angegeben werden oder als relative Entfernung zweier Genloci hinsichtlich ihrer Rekombinationswahrscheinlichkeit. Die Häufigkeit einer Rekombination benachbarter Loci während der Meiose wird durch die Rekombinationsfrequenz Theta ( $\Theta$ ) ausgedrückt. Die genetische Entfernung zwischen zwei Genloci wird in der Einheit Morgan (M) gemessen, wobei ein centi-Morgan (cM) der Erwartung entspricht, dass zwischen zwei Genloci unter 100 Meiosen durchschnittlich eine Rekombination auftritt. Ein centi-Morgan bedeutet eine Rekombinationsfrequenz von 1% ( $\Theta = 0,1$ ). Gene auf unterschiedlichen Chromosomen haben stets eine Rekombinationsfrequenz von 50% ( $\Theta = 0,5$ ), die

Rekombinationsfrequenz bei gekoppelten Genen liegt unter 50% ( $\Theta \leq 0,5$ ) und bei Markern am selben Genort liegt die Rekombinationsfrequenz bei 0% ( $\Theta = 0$ ) [52]. Die Rekombinationsfrequenz ( $\Theta$ ) kann durch unterschiedliche Kartierungsfunktionen (z.B. nach Kosambi) in die genetische Differenz umgerechnet werden. Der Abstand von 1 cM entspricht beim Menschen einer physikalischen Entfernung zweier Loci von 900 kb = 0,9 Mb [135].

Bei der nichtparametrischen Kopplungsanalyse wird unter den Erkrankten nach gemeinsamen Allelen oder gemeinsamen chromosomalen Segmenten gesucht. Der Vorteil bei dieser Form der Kopplungsanalyse ist, dass kein spezifisches, der Krankheit entsprechendes, Krankheitsmodell vorliegen muss [3]. Ziel der nichtparametrischen Kopplungsanalyse ist es, festzustellen, wie häufig Geschwisterpaare identische Kopien des gleichen elterlichen Marker Allels tragen, dies nennt man identical by descent sharing [3,4].

Bei den nichtparametrischen Analysen wird der non-parametric linkage score (NPL-Score) ermittelt, welcher die Kopplungswahrscheinlichkeit angibt.

Mit dem hier verwendeten Programm MERLIN können innerhalb der Alohomora Software parametrische und nichtparametrische Kopplungsanalysen durchgeführt werden.

Grundlage der parametrischen Kopplungsanalyse ist das Auftreten von Rekombinationsereignissen. Bei der parametrischen Kopplungsanalyse muss im Vorfeld das Vererbungsmuster, die Häufigkeit und die Penetranz der Erkrankung definiert werden. Dies bedeutet, dass Voraussetzung für die Durchführung einer parametrischen Kopplungsanalyse die Existenz eines spezifischen Krankheitsmodelles ist. Es muss vorher bekannt sein, ob der Gendefekt autosomal oder geschlechtsgebunden, dominant oder rezessiv vererbt wird. Desweiteren muss bekannt sein, ob es sich bei der Erkrankung um eine seltene oder häufige Erkrankung in der Bevölkerung handelt.

Unter Penetranz versteht man die prozentuale Wahrscheinlichkeit, mit der ein bestimmter Genotyp mit einem bestimmten Phänotyp assoziiert ist. Man unterscheidet vollständige (Genotyp prägt sich immer phänotypisch aus) von unvollständiger Penetranz (trotz vorhandenem Genotyp ist der Phänotyp nicht immer vorhanden) [135]. Geschätzte Prozentsätze über die Penetranz von Erkrankungen können der Literatur oder Datenbanken (z.B. HGMD (Human Gene Mutation Database)) entnommen werden.

Der LOD-Score (Logarithm of the odds), der für verschiedene Rekombinationsfraktionen berechnet werden kann, stellt eine statistische Abschätzung der Wahrscheinlichkeit dar, ob zwei Loci (Genorte) auf demselben Chromosom

gemeinsam vererbt werden [106]. Bei der statistischen Einschätzung der Kopplungswahrscheinlichkeit werden zwei Hypothesen miteinander verglichen: zum einen die Arbeitshypothese  $H_1$  (es besteht Kopplung zwischen Erkrankung und Marker) und zum anderen die Nullhypothese  $H_0$  (es besteht keine Kopplung zwischen Erkrankung und Marker). Unter der Annahme der Nullhypothese  $H_0$  ( $\Theta = 0,5$ ) wird davon ausgegangen, dass eine zufällige Verteilung der Allele vorliegt, da die Allele unabhängig von der Erkrankung vererbt werden und sie in einem identischen Zahlenverhältnis in der Population vorkommen.

Die Odds Ratio ergibt sich aus dem Quotienten der Kopplungswahrscheinlichkeit (Likelihood) bei einer bestimmten Rekombinationsfraktion ( $L$  von  $H_1$  ( $\Theta$ )) und der Wahrscheinlichkeit freier Rekombination ( $L$  von  $H_0$  ( $0,5$ )) also bei Nichtkopplung. Mit Hilfe der beiden Hypothesen können Aussagen über die Wahrscheinlichkeit der Kopplung gemacht werden.

Der dekadische Logarithmus der Odds Ratio ergibt den LOD score ( $Z$ ). Im LOD-Score-Test wird die Wahrscheinlichkeit (Likelihood,  $L$ ) der Kopplung für bestimmte Rekombinationsraten ( $\Theta$ ), also die Abstände zwischen den Loci, überprüft.

Eine Odds Ratio von 1000:1 entspricht einem LOD- Score von  $Z = 3,0$ . Ein LOD- Score  $Z > 3,0$  wird üblicherweise als Indikator für eine Genkopplung angesehen. Dies bedeutet, dass bei einer gemeinsamen Übertragung zweier Loci die Wahrscheinlichkeit 1000 fach größer ist, dass die beiden Loci aufgrund von Kopplung gemeinsam übertragen werden, als die Wahrscheinlichkeit für eine freie Rekombination. Ist der LOD Score  $\geq 3,0$ , so spricht dies signifikant für eine Kopplung zwischen dem Krankheitslocus und dem Marker Locus. Jedoch ist trotzdem zu beachten, dass obwohl der LOD-Score von 3,0 mit einer Wahrscheinlichkeit von 1000:1 für eine Kopplung zwischen den Loci spricht dieser Wert von 3,0 auch ein falsch positiver Wert sein kann. Falsch positiv würde bedeuten, dass trotz eines LOD- Scores von  $\geq 3,0$  keine Kopplung vorliegen würde. Je höher jedoch der LOD Score, desto unwahrscheinlicher ist ein falsch positives Ergebnis.

Beträgt der LOD-Score weniger als  $Z \leq -2$ , so ist dies signifikant für Nichtkopplung, eine Kopplung ist also unwahrscheinlich. Es entspricht einer Wahrscheinlichkeit von 100:1 gegen eine Kopplung zwischen den beiden Loci [106][135].

Aufbauend auf diesem mathematischen Modell zur Berechnung der relativen Wahrscheinlichkeit der Kopplung zweier Loci existieren verschiedene Programme, die Kopplungsanalysen am Computer errechnen (Methoden nach Elston-Stewart oder Lander-Green) [44,81,82,105].

Man kann im Allgemeinen zwischen einer Singlepoint- und einer Multipoint-Analyse unterscheiden. Während bei der Singlepoint-Analyse nur zwei Loci betrachtet werden

und die Rekombinationsrate zwischen ihnen variiert, werden bei der Multipoint Analyse mehrere Loci gleichzeitig berücksichtigt. Der Abstand der weiteren Loci bei der Multipoint-Analyse wird angegeben und bleibt fest, die Anordnung des ersten Locus wird variiert.

Mit dem Elston-Stewart-Algorithmus besteht die Möglichkeit mit sehr großen Stammbäumen zu arbeiten[44]. Allerdings gibt es auch gewisse Einschränkungen. Der Elston-Stewart-Algorithmus ist nur in der Lage mit simplen Stammbäumen zu arbeiten, was bedeutet, dass innerhalb des Stammbaums jede Person entweder mit einer anderen Person der vorigen Generation verwandt sein muss, oder in den Stammbaum hineingeheiratet hat, Konsanguinität sollte jedoch nicht vorliegen. Entsprechen Stammbäume nicht diesen Kriterien, werden sie als komplexe Stammbäume bezeichnet. Der Elston-Stewart Algorithmus ist auf wenige Marker limitiert wegen der exponentiellen Zunahme der Berechnungszeit und der Speicheranforderungen an die Computer [106].

Mit dem Algorithmus nach Lander- Green können nur kleinere Stammbäume berechnet werden. Dafür kann der Lander-Green-Algorithmus, der mit Vererbungsvektoren arbeitet, mit vielen Markern gleichzeitig arbeiten. Hier sind nämlich die Anzahl der Meiosen für die exponentielle Zunahme der Berechnungszeit und Speicheranforderungen verantwortlich, da alle individuellen Meiosen neue Ebenen repräsentiert und die Wahrscheinlichkeiten (Likelihoods) für jeden Knotenpunkt berechnet werden. Von den auf dem Lander-Green-Algorithmus basierenden Programmen wurde in dieser Arbeit die Software MERLIN verwendet [1,80].

Die Einschränkung der Anzahl von Personen richtet sich nach der Formel  $2n - f \leq 18$  ( $n$  sind die nonfounder und  $f$  die founder) [73]. Als founder werden diejenigen Personen in einem Stammbaum bezeichnet, die innerhalb dieses Stammbaumes keine Eltern aufweisen, wohingegen nonfounder Personen sind, deren Eltern ebenfalls innerhalb dieses Stammbaumes zu finden sind [33,46,73].

### **2.9 Kopplungsanalysen mit MERLIN**

MERLIN (Multipoint Engine of Rapid Likelihood Inference) ist ein Programm, welches Kopplungsanalysen durchführt. Es wurde von Goncalo Abecasis von der University of Michigan in den USA geschrieben [1].

Mit dieser Software ist es möglich nichtparametrische und parametrische Kopplungsanalysen durchzuführen. Eingabedateien für MERLIN sind QTDT oder Linkage-Format Dateien.

Zur Kontrolle, ob die Input -Dateien richtig interpretiert werden, sollte eine Analyse mit der Befehlszeile: *prompt>pedstalis-d-p parametric.dat paramtric.ped* erfolgen.

## 2. Material und Methoden

Das Programm benötigt für seine Berechnungen Informationen über die Beziehung der Personen des Stammbaums zueinander (Familie-Person-Vater-Mutter-Sex, Bsp: Proband 659.01: 659-01-09-08-m (*contents von basic.ped*)), welche zur Vereinfachung durch eindeutige numerische Werte ersetzt werden können.

Desweiteren ist eine Beschreibung des Geno- und Phänotyp von Nöten. Phänotyp (U oder 1 für gesund; 1 oder 2 für krank; x oder 0 für unbekannt; Bsp: Proband 659.01 : 1) und Genotyp (1/1 für homozygotes Allel1;  $\frac{3}{4}$  heterozygot in Allel 3 und 4; X, 0 oder N für fehlende Information über den Genotyp, Bsp: Proband 659.01: 1/1 (*contents von basic2.ped*)). Desweiteren ist die Information der chromosomalen Lage von Bedeutung (Chromosom-Marker-Position (cM); Bsp: Proband 659.01 1- Marker position 169778575-169778814 (Marker D1S1660) (*contents von basic2.dat*)). Anstelle der Markerposition in cM kann auch der Markername angegeben werden, sowie die Analyse eines festgelegten Rasters mit n Abständen in cM, in denen die Berechnung erfolgen soll. Auch Daten zur Allelhäufigkeit werden vom System für die Berechnung benötigt (M (Marker Name), F (Allelfrequenz); Bsp: Proband 659.01 D1S1660 7 (*contentst des Allelfrequenz files*)). Für Mikrosatellitenmarker wird die erweiterte Allelfrequenz (A (numerische Allelfolge); Bsp: 659.01 M (Mikrosatellit) A (Abfolge der Allele)) genutzt.

Eine Kurzbeschreibung jedes Datensatzes findet sich unter: pedstats entweder -d (Datendatei) oder -p (Stammbaumdatei) (Befehlszeile: *prompt>pedstats -d-p basic2.dat basic 2.ped*).

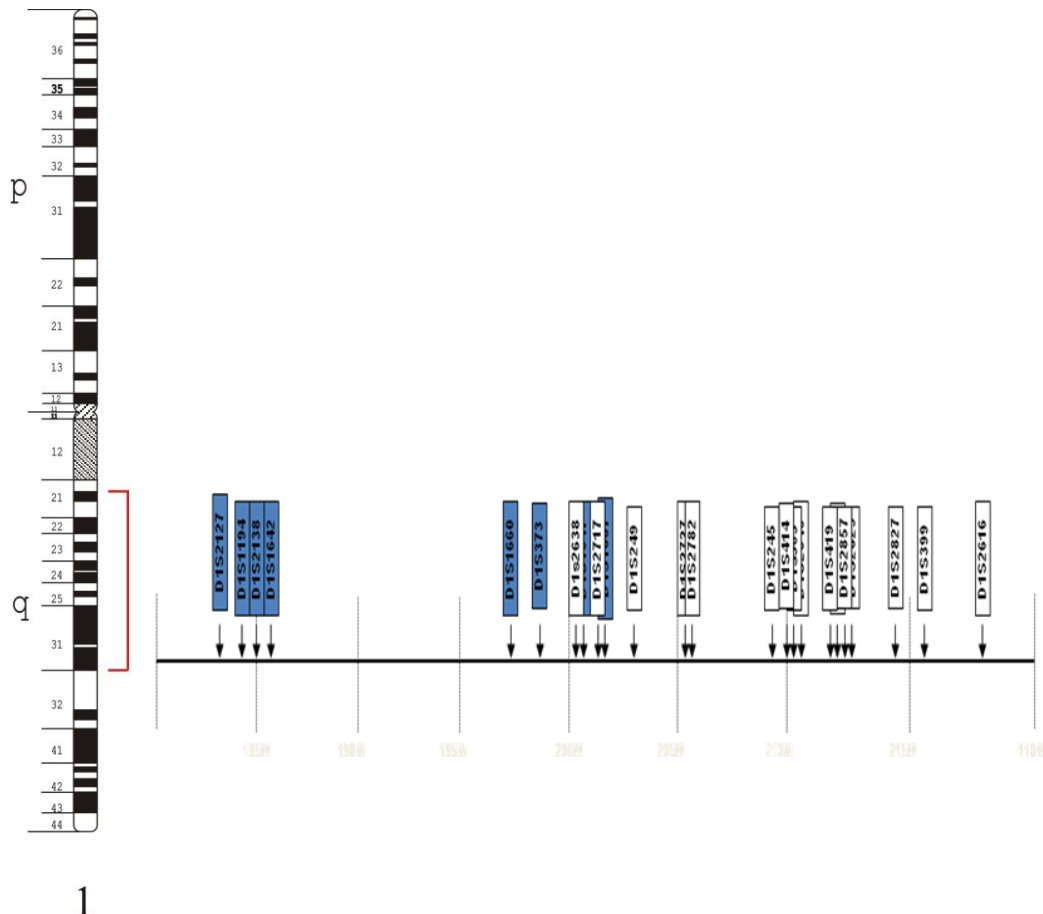
Die parametrische Kopplungsanalyse mit Merlin wird mit 3 verschiedenen Dateitypen beschrieben (Datendatei (paramtric. dat); Stammbaumdatei (parametric.ped); Map-Datei (parametric. map)). Zu oben genannten Daten werden bei der parametrischen Analyse außerdem Daten zum Krankheitsmodell (Model parametric.modell) benötigt. Hieraus und aus oben genannten Daten errechnet das System den LOD-Score der parametrischen Kopplungsanalyse durch die Befehlszeile: *prompt>merlin-d paramtric.dat -p-m parametric.ped parametric.map Modell parametric.modell* für die gesuchten Marker.

Das Analyse-Ergebnis kann als Ergebnis-Graph in PDF Format dargestellt werden (Befehlszeile: *prompt>merlin-d paramtric.dat -p-m parametric.ped parametric.map Modell parametric.modell-Raster (in cM)-Marker Name oder Position-pdf*) (<http://www.sph.umich.de/csg/abecasis/Merlin>).



### 2.10 Identifikation geeigneter Mikrosatellitenmarker (Primer)

In dieser Arbeit wurden vor allem Mikrosatelliten mit Dinukleotidrepeats (CA-Repeats) und Tetranukleotidrepeats eingesetzt, welche nach gründlicher Recherche der Ensemble und NCBI Datenbanken ausgewählt wurden.



1

**Abbildung 5: Position der in dieser Arbeit eingesetzten Mikrosatelliten auf dem Chromosom 1q, 21200-21800Mb**

Bezeichnung	Datenbank ID	Typ	Anzahl Allele	Fragment-länge (bp)	Position im Genom (bp) Sequence Map: Chr1 HuRef Map Viewer Position
D1S2127	CHLC.GATA12F10	TNR	5	112-132	155973874-155974000
D1S1194	UT7705	TNR	1	125	157224075-157224191
D1S2138	CHLC.GATA84H01	TNR	3	237-245	157600347-157600584
D1S1642	CHLC.GATA23B04	TNR	7	248-270	158465596-158465860
D1S1660	CHLC.GATA48B01	TNR	7	226-250	169778575-169778814
D1S1647	CHLC.GATA25A11	TNR	6	223-243	173723625-173723866
D1S2683	AFMa272xd9	DNR	7	177-189	174237315-174237497
D1S2717	rs3222920	DNR	5	228-270	175226077-175226342
D1S249	rs3220605	DNR	11	155-185	176880187-176880359
D1S2727	rs3223018	DNR	6	201-245	177934535-177934759
D1S2782	rs3223530	DNR	10	274-298	178470896-178471185
D1S245	rs3220544	DNR	10	235-253	180281801-180282045
D1S414	AFM179xg5	DNR	10	185-205	181719976-181720160
D1S505	rs3222182	DNR	10	145-167	183293755-183293917
D1S1667	CHLC.GATA63B11	TNR	6	198-218	183447435-183447629
D1S2646	AFMa157tg5	DNR	6	177-211	184732874-184733078
D1S419	rs3220230	DNR	8	162-194	185213189-185213362
D1S2857	rs3219705	DNR	10	211-283	185428059-185428333
D1S2629	rs113620824	DNR	4	157-169	186119942-186120106

**Tabelle 6: Eigenschaften der in dieser Arbeit eingesetzten Mikrosatellitenmarker**

DNR: Dinukleotidrepeat, TNR: Tetranukleotidrepeat

(Markerinformation: [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) und <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>)

### **2.11 Grundprinzipien und Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Methodische Grundlage zur Darstellung eines Mikrosatelliten ist die enzymatische Amplifikation seiner spezifischen DNA-Sequenz mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion [100]. Voraussetzung für die Durchführung einer PCR ist die Kenntnis der Basensequenz des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts, sodass zwei Oligonukleotid-Primer (ein forward primer und ein reverse primer), die komplementär zu den Enden des DNA-Abschnitts der interessierenden Region sind, ausgewählt werden können. 1986 wurde die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR: engl. Polymerase chain reaction) von Kary B. Mullis entwickelt [101]. Dieses Verfahren

ermöglicht die millionenfache enzymatische Vervielfältigung definierter Nucleinsäuresequenzen. Der Vorteil des Verfahrens besteht in den sehr geringen Mengen an Ausgangsmaterial, die zur Herstellung größerer Mengen Produkt ausreichen.

Die Reaktionsabläufe bei der Amplifikation des DNA-Strangs mittels der PCR ähneln den Abläufen bei der natürlichen Replikation der DNA, die bei jeder Zellteilung im menschlichen Körper auftreten.

### 1.Schritt: Hitzedenaturierung, Überführung in einzelsträngige DNA

Ausgehend von einer einzelsträngigen DNA-Matrize (Template) synthetisiert eine DNA-Polymerase einen komplementären Strang zur Matrize. Da für die Trennung der beiden Einzelstränge erhöhte Temperaturen notwendig sind, werden für die DNA-Synthese hitzestabile DNA-Polymerasen benutzt.

Der PCR Zyklus beginnt mit der thermischen Denaturierung des DNA-Doppelstranges bei 94 - 96°C, wodurch zwei zueinander komplementäre einzelsträngige DNA Templates entstehen.

### 2.Schritt: Hybridisierung der Oligonukleotid-Primer an die Vorbild-(Template)-DNA (Annealing)

Nach der Denaturierung findet die Primer-Hybridisierung (Annealing) statt. Hierbei binden die Primer, die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren, an die komplementären Sequenzabschnitte. Die für das Annealing benötigte Temperatur, hängt hierbei von den Primern ab, typischerweise liegt diese zwischen 50 und 65°C. Als Startermoleküle für die DNA-Polymerase werden bei der PCR synthetische Oligonukleotide (sogenannte Primer), mit etwa 20 - 30 Nukleotiden Länge, verwendet, welche am 3' Ende des kodierenden und nicht kodierenden Stranges mit dem Template hybridisieren. Mit Hilfe der Oligonukleotide und deren gezielter Auswahl, ist es möglich, festgelegte Sequenzenabschnitte zu vervielfältigen.

### 3.Schritt: DNA-Synthese durch die DNA-Polymerase

Durch diesen Vorgang wird die Amplifikation der zwischen den Primern gelegenen Abschnitte mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase (z.B. Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) bei 72°C eingeleitet. Durch zyklische Wiederholungen dieser Teilschritte kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung der gewünschten Sequenz. Inzwischen werden unterschiedlichste rekombinante thermostabile Polymerasen angeboten, die besondere Eigenschaften, wie z.B. eine Selbstkontrolle besitzen.

### Protokoll: PCR

#### dNTP-Mischung:

100 mM	dATP	1,25 µl
100 mM	dCTP	1,25 µl

## 2. Material und Methoden

100 mM dGTP	1,25 µl
100 mM dTTP	1,25 µl
1xTE-Puffer	950 µl

DNA Gebrauchslösung: DNA-Konzentration 20 ng/µl

PCR-Standardansatz: 10 µl

ddH <sub>2</sub> O dest.	2,8 µl
Puffer	2 µl
25 mM MgCl	0,8 µl
0,1 µM dNTP	1,6 µl
10 pmol/µl Primer a	0,4 µl
10 pmol/µl Primer b	0,4 µl
DNA Gebrauchslösung (20 ng/µl)	2 µl
Taq-Polymerase	0,04 µl

Um die Allele einer Person bezüglich eines Markerlocus darzustellen, wurde ein flankierender DNA-Abschnitt zu dem Mikrosatelliten zwischen zwei spezifischen Primern mittels PCR vervielfältigt.

Die berechnete Menge an Puffer, MgCl (25 mM), dNTP, Primer a, Primer b, DNA Gebrauchslösung (20 ng/µl), Taq-Polymerase und ddH<sub>2</sub>O dest. wurde in ein PCR Softtube (0,2 ml) pipettiert. Die Ansätze wurden im Thermocycler mit einem primer-spezifischen Programm (spezifische Annealing-Temperatur) inkubiert.

Die PCR-Produkte wurden in weiterführenden Untersuchungen mit Hilfe einer Gelelektrophorese auf ihre Spezifität hin überprüft [12]. Nach erfolgreicher Amplifikation wurden die Amplifikate mit Hilfe der Kapillarelektrophorese (QIAxcel) näher untersucht.

### **2.12 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarose-Gelelektrophoresen**

Die Agarose- Gelelektrophorese wird zur Prüfung von DNA-Fragmenten (z.B. PCR-Produkten) über die Darstellung deren Länge und Reinheit eingesetzt.

Da die Nukleinsäuren durch ihre Phosphatgruppen negativ geladen vorliegen, wandern sie, wie alle anderen negativ geladenen Moleküle, in einem elektrischen Feld mit den Elektronen in Richtung Anode. Die Agarose-Gelmatrix wirkt hierbei wie ein Filter. Durch das elektrische Feld werden die Nukleinsäureketten linearisiert, sodass sich der Nukleinsäuredoppelstrang durch die Poren des Filters schlängeln kann. Je nach Größe und Ladung der Nukleinsäureketten wandern die Ketten unterschiedlich schnell durch das Gel. Kurze Ketten wandern schneller als lange Nukleinsäureketten. Für DNA-Moleküle bis zu einer Länge von 15 kb gilt: Der Logarithmus der elektrophoretischen

## 2. Material und Methoden

Beweglichkeit ist proportional zur Agarosekonzentration im Gel. Oberhalb dieser Länge wandern die DNA-Moleküle mit annähernd gleicher Geschwindigkeit [125][36].

0,6 - 1,2%ige Agarose-Gelelektrophoresen trennen Fragmente von 1 kb bis zu 15 kb der Größe nach auf. Für kürzere Fragmente werden 1,5 - 2%ige Agarosegele verwendet. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt in diesem Größenbereich hauptsächlich von der Fragmentlänge, kaum von der Basenzusammensetzung ab [36]. Es stehen unterschiedlich Färbemethoden der DNA in Gelen zur Verfügung. Die einfachste Methode besteht in der Färbung mit Ethidiumbromid (2,7-Diamino-10-ethyl-9-phenylphenanthridiumbromid), welches der Gelmatrix zugesetzt wird. Bei Ethidiumbromid handelt es sich um einen heterozyklischen roten Phenanthridin-Farbstoff, der als mutagen und giftig eingestuft wird. Er interagiert mit dem Ringsystem zwischen den Basenpaaren der DNA-Moleküle, woraufhin seine Fluoreszenz gegenüber dem freien Ethidiumbromid erhöht wird. Ethidiumbromid zeigt bei einer Anregung mit UV-Licht einer Wellenlänge von 302 nm und 360 nm eine Eigenfluoreszenz. Interagiert das Ethidiumbromid mit Nukleinsäuren, verändert dies sein Absorptionsspektrum auf UV-Licht der Wellenlänge 254 bis 260 nm. Die Intensität der Fluoreszenz-Emission ist im Nukleinsäure-Ethidiumbromidkomplex effektiver und nimmt dabei um den Faktor 50 – 100 zu, sodass selbst sehr geringe DNA Mengen nachgewiesen werden können [125].

### Agarose-Gel Herstellung:

#### 10x TBE-Puffer:

1 M	Tris	121,1 g/l
0,83 M	Borsäure	51,36 g/l
10 mM	EDTA 2 H <sub>2</sub> O 2 Na	3,72 g/l

Gelvolumen	Laufbedingungen	Probenanzahl	1x TBE	Agarose	Ethidiumbromid
50 ml	100 Volt, 45 min	20 Proben	49 ml	1 g	10 µl
100 ml	100 Volt, 60 min	48 Proben	98 ml	2 g	15 µl
250 ml	120 Volt, 90 min	192 Proben	245 ml	5 g	20 µl

### **Tabelle 7: Versuchsbedingungen bei 2%igem Agarose Gel**

Die Agarose wurde in einem Erlenmeyerkolben eingewogen und in entsprechender Menge mit 1x TBE-Puffer aufgegossen.

Der Erlenmeyerkolben wurde mit Alufolie verschlossen und in der Mikrowelle bei 700 Watt ca. 1 min erhitzt, bis sich die Agarose gelöst hat (Lösung wird klar). Der Ansatz wurde erneut gewogen und die Gewichts Differenz (Flüssigkeitsverlust durch

verdampfen) wurde durch Ionenaustauscherwasser aufgefüllt und dann auf dem Schüttler bewegt bis sie handwarm war.

Zu der Lösung wurde die entsprechende Menge an Ethidiumbromid (siehe Tabelle 7) hinzu pipettiert.

Das Gel wurde in den Gelträger eingegossen und der Kamm oder die Kämme eingesetzt, bis das Gel ausgehärtet war.

Im Anschluss wurde der Gelträger in die Kammer eingesetzt und die Kammer mit TBE-Puffer überschichtet und die Kämme herausgezogen.

Die Slots des Gels wurden mit jeweils 5 µl des PCR-Produkts befüllt. In den ersten Slot jeder Reihe wurden zur Bestimmung der Fragmentgröße 7 - 10 µl eines DNA-Markers (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, Fermentas) eingefüllt und die Elektrophorese wie in Tabelle 7 angegeben durchgeführt.

Die Nukleinsäureketten auf den Gelen wurden nach der Auftrennung in der Gelelektrophorese mit einem Gendokumentationsgerät (Bio Doc Analyser, Biometra (Göttingen)) mittels UV-Licht sichtbar gemacht, elektronisch dokumentiert und ausgedruckt. Die Größe der aufgetrennten Banden wurde durch Vergleich mit dem Molekulargewichtsmarker (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, Fermentas) ermittelt. In einem 2%igen Agarosegel sind Längendifferenzen der Fragmente von 15 - 20 bp separierbar [36].

### **2.11 Kapillarelektrophorese mit der QIAxcel**

Das QIAxcel- System (Qiagen) mit dem zugehörigen QIAxcel DNA Screening Kit (Qiagen) wird zur schnellen Auftrennung von Nukleinsäureketten nach ihrer Größe genutzt.

Das QIAxcel-System bietet einige Vorteile im Gegensatz zu den bisher üblichen Gelelektrophoreseverfahren. Es bietet eine höhere Sensitivität, eine bessere Auflösung (2 - 5 bp), eine geringere Menge an benötigtem Probenmaterial (15 µl PCR-Produkt, im Vergleich zur Agarosegelelektrophorese 1/10 mit QX Dilution Buffer verdünnt), die Verarbeitung größerer Probenmengen (96 Proben/Lauf) und eine standardisierte Datenerfassung und -analyse.

Die Auftrennung erfolgt in einer Kapillargelelektrophorese. Das Gel befindet sich in einer vorgefertigten Kartusche mit zwölf Kapillaren, über die die Proben automatisch aufgenommen werden. Mit jeder Probe wird ein QX Alignment Marker mit in die Kapillare aufgenommen, der zwei DNA-Fragmente bei 15 bp und 500 bp enthält und dadurch den Auswertebereich der Elektrophorese definiert. Der Lauf jeder Nukleinsäureprobe findet in einer eigenen Kapillare statt. Es können pro Durchgang 96 Proben in Gruppen zu 12 Proben separiert und quantifiziert werden.

## 2. Material und Methoden

Durch die angelegte Spannung wandert die negativ geladene DNA zum positiv geladenen Ende der Kapillare und nimmt dabei Ethidiumbromid aus der Gelmatrix auf, bis sie den Detektor erreicht, der das Fluoreszenzsignal quantifiziert. Über die ermittelten Migrationszeiten eines Größenstandards (QX-DNA-Size-Marker), welcher als Referenzwert dient, werden die Fragmentgrößen der Proben berechnet. Das Signal wird durch die ScreenGel Software digitalisiert und kann dann als Elektropherogramm oder als Gelbild dargestellt werden. (QIAxcel DNA Handbook 2008).

In dieser Arbeit erfolgte die elektrophoretische Probenauftrennung mit dem QIAxcel DNA High Resolution Kit (Qiagen) sowie der vorinstallierten Methode OM700, die für DNA-Konzentrationen zwischen 10 - 100ng/µl geeignet ist. (QIAxcel DNA Handbook 2008).

Methode	Injektionsspannung	Injektionszeit	Trennungsspannung	Trennungszeit
OM700	5 KV	10 s	3 KV	700 s

### **Tabelle 8: M-Methode bei Benutzung des QIAxcel DNA High Resolution Kit**

Bei der OM700 -Methode wurden 0,1 µl der DNA Proben gemeinsam mit dem Alignmentmarker (QX Alignment Marker 15 bp/500bp, Qiagen) während einer 10 sekundigen Injektionszeit unter 5 kV in die Gel-Kapillare aufgenommen und bei 3 kV für 700s aufgetrennt.

Die ScreenGel Software (Version 1.00 Qiagen) errechnete sowohl die Fragmentgröße, als auch die Konzentration der Proben anhand der Migrationszeit in der Kapillare im Vergleich zum QX DNA Size Marker 25 - 450bp.

#### Versuchsprotokoll:

QX Alignment Marker 15 bp / 500bp	15 µl
QX Mineral Oil	2 µl
QX Dilution Buffer	9,9 µl bzw. 13,5 µl
QX DNA Size Marker 25 - 450 bp	0,1 µl
PCR-Probematerial	1,5 µl

Der QX DNA Size Marker (25 - 450bp auf) wurde auf 1/10 mit dem QX Dilution Buffer verdünnt und 10 µl in den ersten Tube des ersten 0,2 ml 12-Tube Strips gegeben (dieser Vorgang wurde alle 10 Läufe wiederholt).

15 µl des ausgewählten QX Alignment-Markers wurde in alle 12 Vertiefungen eines 0,2 ml 12 Tube Strips geben und mit Mineral Oil überschichtet. Der Strip wurde in die MARKER 1 Position gestellt (Austausch alle 15 - 20 Läufe oder alle 3 Tage).

## 2. Material und Methoden

Das mittels PCR gewonnene Probematerial wurde auf 1/10 mit QX Dilution Buffer verdünnt und jeweils 15 µl in ein Tube eines 0,2 ml 12-Tube Strips geben. Das minimale Probevolumen für eine Analyse betrug 10 µl, wobei nur 0,1 µl bei jedem Lauf in die Kapillare injiziert wurden.

Die Proben wurden in das QIAxcel System eingesetzt und die Elektrophorese über das Kontrollprogramm gestartet (*QIAxcel DNA Handbook, QIAGEN, Sample und assay Technologies, 2008 und [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)*).



### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Patientenkollektiv und Vorscreening**

Grundlage dieser Arbeit war eine konsanguine (3 bekannte Konsanguinitätsschleifen über 4 Generationen) kurdische Familie (Familie 659) bestehend aus 7 Generationen (97 Personen), in der sechs Personen an frühkindlicher Netzhautdegeneration erkrankt sind (siehe Abbildung 4).

Die Familie 659 wurde erstmalig mit den betroffenen Geschwistern (659.01, 659.02, 659.04, 659.05) 1989 in der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Gießen vorstellig. Zwischen 1989 und 2010 wurden die Patienten regelmäßig untersucht (Alter: 4 Monate bis 22 Jahre). In den folgenden Jahren fielen in der Familie noch zwei weitere Betroffene (659.07, 659.10) auf, welche ebenfalls regelmäßig untersucht wurden (Alter 3 Monate bis 10 Jahre). Der Indexpatient 659.01 wurden hinsichtlich ursächlicher Mutationen in *GUCY2D*, *RPE65*, *LRAT*, *AIPL1*, *CRX* und *CEP290* mittels SSCP-Screening-Untersuchungen im molekulargenetischen Labor der Abteilung für pädiatrische Ophthalmologie, Strabismologie und Ophthalmogenetik der Universität Regensburg untersucht. Mutationen in den genannten Genen konnten nicht identifiziert werden. Daraus wurde der Schluß gezogen, dass noch mindestens ein weiterer Genort existieren muss, der für das Krankheitsbild der frühkindlichen Netzhautdegeneration in dieser Familie verantwortlich ist.

#### **3.2 Klinische Untersuchungen**

Die Patienten (659.01, 659.02, 659.04, 659.05, 659.07, 659.10) wurden in regelmäßigen Abständen (alle 2 - 3 Jahre) klinisch untersucht. Für die hier vorliegende Arbeit wurden die Krankenblätter der Patienten ausgewertet.

Zu den Untersuchungstechniken gehörten nach Erhebung der Anamnese die Testung des Visus, die Testung der Pupillenfunktion, die Testung der Farbwahrnehmung, die Fundoskopie und Fundusphotographie, die Fundusautofluoreszenzaufzeichnung, die optische Kohärenztomographie, die 2-Farben-Schwellenperimetrie, das Ganzfeld-Elektroretinogramm sowie elektrophysiologische Verfahren wie die Ableitung visuell evozierter Potentiale.

Die Ergebnisse der klinischen Untersuchung der sechs Patienten sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

### 3. Ergebnisse

Patient	659.04	659.01	659.02	659.05	659.07	659.10
Nystagmus	kongenital	kongenital	kongenital	kongenital	kongenital	kongenital
Blendempfindlichkeit	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Farbsehen	↓	↓	↓	↓	↓	n.b.
Pupillenreaktion	<b>22 J:</b> +	<b>4 M:</b> + <b>20 J:</b> +++	<b>19 J:</b> +	<b>17 J:</b> +	<b>10 J:</b> +	<b>4 J:</b> + (helles Licht)
Visus/Refraktion	<b>3 J:</b> RA +11,25 / -3,5 / 5° LA +11,25 / -3,5 / 172° <b>5 J:</b> RA +11,0 / -3,5 / 8° LA +11,0 / -3,25 / 10° TAC : RA 0,07 LA 0,05 <b>7 J:</b> RA +7,250 / -4,5 / 19° = 0,034 LA +7,25 / -3,5 / 170° = 0,036 D: 0,04 C: < 0,1 <b>11 J:</b> RA +10,0 / -3,5 / 20 = 0,008 LA inkomplette LW <b>14 J:</b> BA inkomplette LW <b>22 J:</b> BA LW	<b>8 M:</b> Lichtverfolgung ohne Fixation <b>2 J:</b> RA +4,5 / -3,0 / 20° LA +5,25 / -3,75 / 170° <b>5 J:</b> RA +4,5 / -3,0 / 15° LA +5,25 / -3,75 / 176° = 0,04 <b>8 J:</b> RA +4,0 / -3,0 / 12° = 0,1 / 30 LA +4,5 / -3,25 / 165° = 0,008 <b>10 J:</b> RA n.d., LA 0,006 <b>20 J:</b> BA LW	<b>1 J:</b> inadäquate Fixierung <b>1,5 J:</b> RA +10,5 / -3,0 / 10° = 0,05 LA +9,5 / -1,5 / 176° = 0,0125 <b>4,5 J:</b> RA +6,5 / -3,0 / 0° = 0,02 LA +7,5 / -2,75 / 176° = 0,04 <b>7 J:</b> RA +5,75 / -3,75 / 9° LA +6,5 / -2,5 / 171° BA 0,05 <b>10J:</b> RA +5,75 / -3,5 / 10° LA +6,75 / -2,5 / 162 = BA 0,05 <b>11J:</b> RA +5,5 / -2,75 / 12° = LW LA +6 / -2,25 / 165° = 0,032 <b>14 J:</b> BA, LW <b>19 J:</b> RA +1,0 / -3,0 / 29° LA +0,75 / -2,75 / 154° BA LW	<b>1 J:</b> BA +5,5, Abwehr <b>2,5 J:</b> RA +8,5 / -3,5 / 178° LA +8,5 / -3,5 / 12° Fixation möglich <b>5 J:</b> RA +6,5 / -4,5 / 14° LA +6,5 / -3,5 / 5° BA 0,04 <b>7 J:</b> RA +6,5 / -4,5 / 14° LA +6,5 / -3,5 / 5° LH BA 0,04 <b>9J:</b> RA +6,74 / -4,0 / 8° LA +6,0 / -5,75 / 168° BA 0,04 <b>10 J:</b> RA +6,5 / -4,0 / 7° LA +6,0 / -3,75 / 171° BA 0,04 <b>17 J:</b> RA +3,25 / -4,0 / 2° <0,008 LA +1,25 / -4,0 / 170° = 0,008	<b>3 M:</b> BA +5,5 keine Reaktion auf Licht <b>7 M:</b> BA +7,0 / -1,0 / 0°, TAC: 0,03 <b>14 M:</b> TAC 0,034 <b>19 M:</b> TAC RA: 0,034, LA: 0,014 <b>2 J:</b> AE +5,5 / -1,5 / 12° = 0,05 TAC LA +5,75 / -2,25 / 0° = 0,025 TAC <b>3 J:</b> RA +5,5 / -1,5 / 12° LA +5,75 / -2,25 / 0° BA 0,08 TAC <b>6 J:</b> RA +2,5 / -1,5 / 16° = 0,05 LA +2,5 / -1,5 / 170° = 0,01 <b>8 J:</b> RA +1,5 / -3,75 / 8° LA +1,25 / -3,5 / 158° <b>10 J:</b> BA LW	<b>1 J:</b> keine Kooperation <b>4 J:</b> RA +4,0 / -1,50 / 15° LA +4,5 / -1,75 / 152° kein visueller Kontakt zu anderen Personen
Gesichtsfeld	<b>11 J:</b> Goldmann III/4 n.d.	<b>8 J:</b> Goldmann III/4 RA 30°, LA 30° - 20° - 15° - 5° <b>10 J:</b> Goldmann III/4 n.d.	<b>7 J:</b> n.d. <b>10 J:</b> Goldmann RA III/4 .d., V/4: 22° - 5° - 5° - 10°	<b>5 J:</b> Goldmann III/4 RA 20 - 25°, LA 25 - 30° <b>7 J:</b> Goldmann III/4 RA 18°-25°-15°-20°	<b>8 J:</b> Goldmann: minimal zentrale Wahrnehmung	n.d.

### 3. Ergebnisse

			LA III/4: 10° - 10° - 10° - 8°	LA 15°-20°-60°-50° <b>10 J:</b> Goldmann III/4 BA 20° V/4 BA 40 - 50° <b>17 J:</b> Goldmann III/4 BA n.d. V/4 RA 20 - 40° LA 40 – 50°		
Fundus/Fundusautofluoreszenz	<b>3 J:</b> kein MWR (bull's eye macula), regelrechter NO und Peripherie <b>5 J:</b> heller NO, verminderte Gefäße, Makulaveränderungen, Periphere fleckige Veränderungen <b>7 J:</b> regelrechter NO, Depigmentierung der Makula <b>11 J:</b> periphere NO Degeneration, weiß-gelbliche Makulaveränderungen, verminderte Gefäße <b>14 J:</b> heller NO, weiß-gelbliche Makulaveränderungen <b>22 J:</b> wächserner NO, Makula Depigmentierung, Knochenbälkchen, verminderte Gefäße (Abb.6 D,E,F)	<b>4 J:</b> regelrechter NO, Makula, Peripherie <b>5 J:</b> regelrechter NO, Pigmentveränderungen der Makula, verminderte Gefäße, reguläre Peripherie <b>8 J:</b> heller NO, Pigmentveränderung der Makula im Sinne einer vitelliformen Makulopathie, regelrechte Peripherie <b>10 y:</b> NO ↓, gelblich-weiße Pigmente in der Fovea, verminderte Gefäße <b>15 J:</b> regulärer NO, verminderte Gefäße, blasse Makula mit Pigmentveränderungen, reguläre Peripherie <b>20 J:</b> blasser NO, verminderte Gefäße, Makula mit gelblich weißen Pigmentveränderungen	<b>4,5 J:</b> NO wie bei Hyperopie, Makula mit vitelliformer Makulopathie, regelrechte Peripherie <b>7 J:</b> blasser NO, vitelliformes Pigment in Fovea, regelrechte Peripherie <b>10 J:</b> regelrechter NO, verminderte Gefäße, Makula und mittlere Peripherie mit Zeichen der Dystrophie <b>19 J:</b> atrophischer NO, Makula Degeneration, verminderte Gefäße, Pigmentveränderungen der Peripherie FAF: gefleckt, ↓ (Abb.6 A,B,C)	<b>2,5 J:</b> regulärer NO, nasale Unschärfe, verminderte Gefäße, reguläre Peripherie, vitelliforme Pigmentveränderungen der Makula <b>7 J:</b> MWR abnormal, Unregelmäßige Pigmentierung <b>9 J:</b> blasser NO, irregulärer MWR <b>17 J:</b> blasser NO, Hyper- und Depigmentierung der Makula, verminderte Gefäße, Pigmentveränderungen der Peripherie (Abb.6 G,I,H)	<b>7 M:</b> regelrechter NO, Makula, Peripherie <b>2 J:</b> regelrechter NO und Peripherie, flauer MWR <b>3 J:</b> verminderte Gefäße, Aufhellung der Makula mit dunklem Halo <b>6 J:</b> regulärer NO, stark verminderte Gefäße, Makula mit dunklem Halo <b>8 J:</b> blasser NO, unregelmäßige Makulaoberfläche, grobflächige Pigmentunregelmäßigkeiten in der Peripherie <b>10 J:</b> idem zu 8J (Abb.6 J,K) Fundusautofluoreszenz: reduzierte Fundusautofluoreszenz in der Makula, verstärkte Fundusautofluoreszenz außerhalb der Makula (Abb.7 B,C)	<b>1 J:</b> unauffälliger NO, Peripherie, Makula mit Narbe <b>4 J:</b> Degeneration der Makula, NO, Gefäße unauffällig, Pigmentierung unregelmäßig FAF ↓ in Makula
Elektrophysiologie	<b>5 J:</b> ERG u.N.		<b>10 J:</b> ERG u.N.	<b>9 J:</b> ERG: u.N.	<b>2 J:</b> VEP nicht auslösbar <b>8 J:</b> ERG u.N.	
Optische Kohärenz	<b>22 J:</b> Dicke der Retina		<b>19 J:</b> Dicke der Retina		<b>10 J:</b> Dicke der Retina ↓,	

### 3. Ergebnisse

Tomographie	↓, irregulärer Reflex über dem RPE (Abb.8 C)		↓, irregulärer Reflex über dem RPE (Abb.8 B)		Verlust der Schichtung vor allem in der äußeren Retina (Abb. 8 A)	
2-Farben-Schwellenperimetrie		<b>20 J:</b> RA: u.N. LA: skotopische Residuen beim roten Stimulus		<b>17 J:</b> LA: ausgeprägter Verlust der skotopischen Sensitivität, blau u.N.	<b>10 J:</b> RA: skotopisch u.N.	

#### **Tabelle 9: Phänotypische Ausprägung der RD3 Mutation bei den Betroffenen der Familie 659**

+ vorhanden; ++ stark ausgeprägt; +++sehr stark ausgeprägt; ↓ reduziert; ↑ erhöht; Ø nicht vorhanden; n.d. nicht durchführbar; n.u. nicht untersucht; J Jahre, M Monate; RA rechtes Auge; LA linkes Auge; BA beide Augen, HB handbewegungen; LW Lichtwahrnehmung; D Distanz; TAC Teller Acuity cards; LH LH-cards; MWR Makulawallreflex; NO Nervus opticus; u.N. unter der Nachweisgrenze; FAF Fundusautofluoreszenz

### 3. Ergebnisse

Alle klinischen Untersuchungen und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gestalteten sich auf Grund des zum Teil jungen Alters der Patienten sowie dem ausgeprägten Nystagmus der Patienten schwierig. Die Qualität der Untersuchungsergebnisse war deshalb häufig suboptimal.

Der Visus der Patienten wurde mittels Teller Acuity Cards (TAC)(bis zum 2. Lebensjahr), Lea-Cards (bis zum 6. Lebensjahr) sowie dem Buchstaben E (E-Haken-Test) (ab dem 6. Lebensjahr) bestimmt. Der Visus der Patienten stellt sich nie besser als 0,08 (LogMAR <1,12) mittels Teller Acuity Cards und 0,05 (logMAR 1,3) mittels E-Haken dar. Der Visus verschlechterte sich im Verlauf des Beobachtungszeitraumes bis hin zur Lichtscheinwahrnehmung.

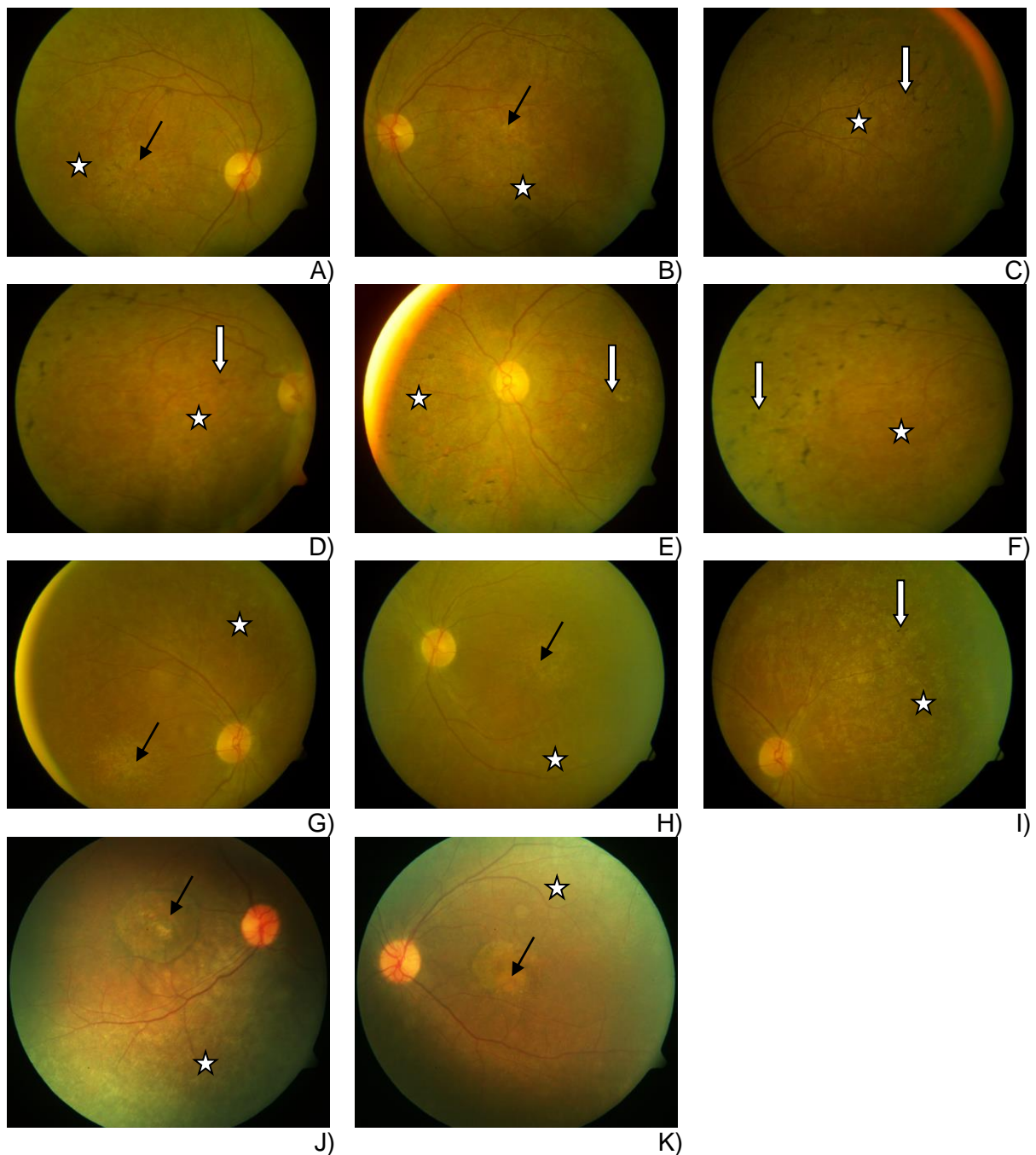
Initial zeigt sich eine hypermetropische Refraktion, aus der sich im Verlauf eine myopische Refraktion entwickelte.

Die Pupillenreaktion ist von Anfang an träge. Weitere ophthalmologische Untersuchungen beinhalteten einen Pupillenfunktionstest und einen Farbensehtest (Farnsworth oder Lanthony Panel D15), bei dem sich die Farbwahrnehmung deutlich reduziert zeigt.

Alle Patienten gaben bei der Anamnese eine erhöhte Blendempfindlichkeit an und schilderten eine Verbesserung unter Kantenfiltergläsern (Clarlet F580 and F90, Carl Zeiss, Jena, oder ORMA RT70 Essilor, Hanau).

Die Fundusphotographien wurden mittels einer Standard Zeiss Fundus Kamera (FF450, Carl Zeiss Medic, Jena) hergestellt und ermöglichen rückblickend zu den unterschiedlichen Zeitpunkten eine Analyse der Fundusveränderungen. Die Funduskopien vor dem zweiten Lebensjahr sind jeweils unauffällig. Ab dem zweiten Lebensjahr zeigt sich eine Rarifizierung der Gefäße, eine zunehmende Abnahme des Makulawallreflexes bis hin zur Entwicklung einer sogenannten „bull's eye“ Makulopathie mit zentraler Einlagerung eines gelben Pigments bereits im Jugendalter (Patient 659.07, Abbildung 9 J, K, Patient 659.05, Abbildung G, H). In der zweiten Lebensdekade und zu Beginn der dritten Lebensdekade (Patient 659.02, Abbildung 9 A, B, C; Patient 659.04, Abbildung 9 D, E, F; Patient 659.05, Abbildung 9, G, H, I) zeigt sich zusätzlich im Bereich der Peripherie ein inhomogenes Bild mit Knochenbälkchen als Zeichen der zunehmenden retinalen Degeneration.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 6: Fundusphotographien der Patienten der Familie 659**

A,B,C: Patient 659.02 19 Jahre,

D,E,F: Patient 659.04, 22 Jahre,

G,H,I: Patient 659.05, 17 Jahre,

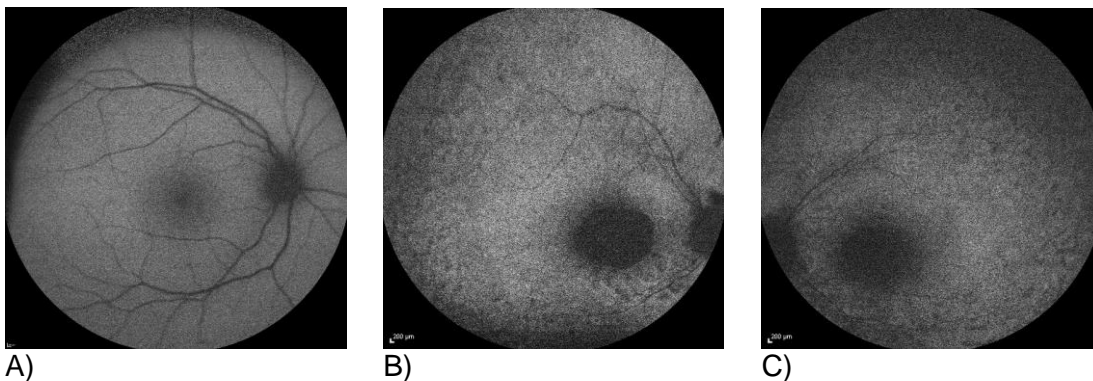
J,K: Patient 659.07, 10 Jahre

Schwarzer Pfeil: „bulls eye“ Makulopathie mit zentraler Einlagerung eines gelben Pigments ,

Weißer Pfeil: Knochenbälkchen, Weißer Stern: inhomogenes Bild der Peripherie

### 3. Ergebnisse

Bei der Fundusautofluoreszenz wird die Verteilung von Vitamin A-Abbauprodukten im retinalen Pigmentepithel aufgrund ihrer Eigenfluoreszenz mittels eines Laserophthalmoskops dargestellt [91]. Die Fundusautofluoreszenz wurde mit einem Heidelberg Retina Angiograph (HRA) Modul einer Spektralis Einheit (Heidelberg Engineering, Heidelberg) aufgenommen. Das erhaltene Signal wurde mittels eines automatischen Software-Tools (ART) verstärkt. Eine aussagekräftige Fundusautofluoreszenz konnte lediglich bei Proband 659.07 (im Alter von 7 Jahren) detektiert werden. Hierbei zeigte sich ein stark reduziertes Signal im Bereich der zentralen Makula mit verstärktem Signal außerhalb der Makula (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Fundusautofluoreszenzaufnahmen**

A) Normalproband, B) Patient 0659.07 rechtes Auge, C) Patient 0659.07 linkes Auge. Auffällig sind die reduzierte Fundusautofluoreszenz in der Makula und die verstärkte Fundusautofluoreszenz außerhalb der Makula

Die Schichtung der Retina wurde mit Hilfe der Optischen Kohärenztomographie (OCT) dargestellt. Im OCT wird die Reflexion eines kohärenten Lichtstrahls an einer definierten Stelle und einer definierten Eindringtiefe (A-Scan) gemessen. Durch Aneinanderreihung mehrerer A-Scans entsteht eine Schnittdarstellung (B-Scan), die durch Aneinanderreihung mehrerer B-Scans zu einer Volumendarstellung (C-Scan) kombiniert werden kann. Mit diesem Untersuchungsverfahren lassen sich die morphologischen Schichten der ca. 250 – 300 µm dicken Netzhaut und des angrenzenden RPEs darstellen [42].

Die optische Kohärenztomographie wurde mittels einer Spektralis OCT-Einheit (Heidelberg Engineering, Heidelberg) durchgeführt. Aufzeichnungen der Einzelscans der Makula konnten von Patient 659.07 im Alter von 10 Jahren, von Patient 659.02 und von Patient 659.04 zu Beginn der dritten Lebensdekade durchgeführt werden. Auf Grund des ausgeprägten Nystagmus der Patienten sind die Ergebnisse schwierig zu beurteilen.

### 3. Ergebnisse

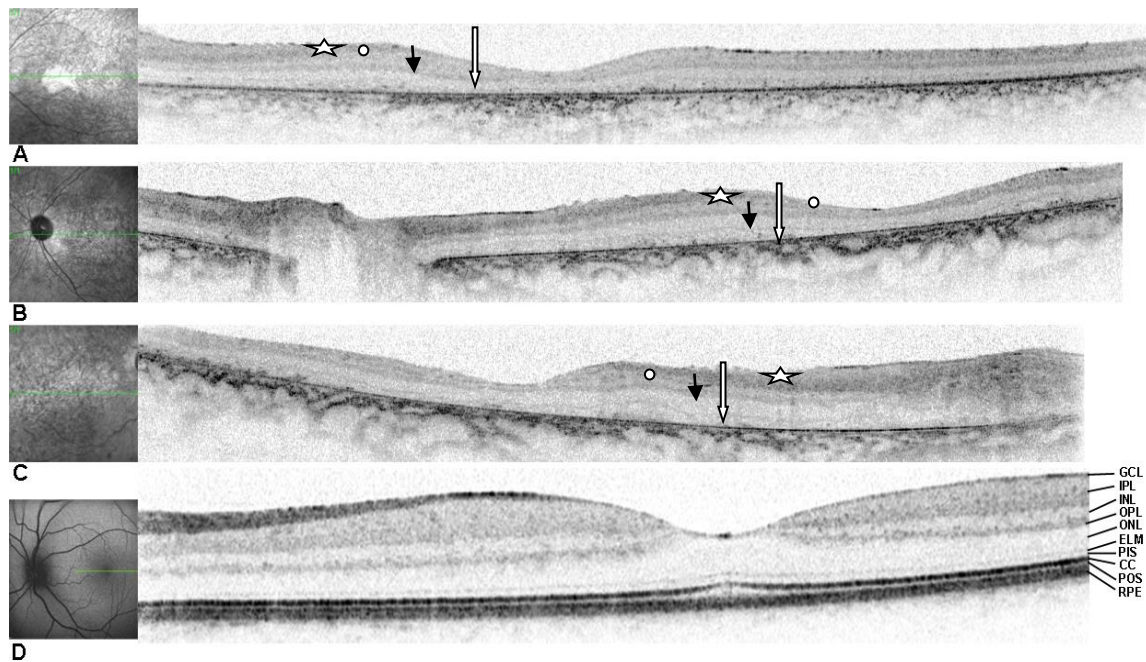
Bei Patient 659.07 (Abbildung 8 A) zeigt sich die Retina in allen Schichten unstrukturiert. Das Außensegment der Photorezeptorzellen und das retinale Pigmentepithel fehlen (Abbildung 8 A, weißer Pfeil).

Das Innensegment der Photorezeptorzellen sowie die Bruchsche Membran sind erhalten, jedoch deplaziert (Abbildung 8 A, schwarzer Pfeil). Die Dicke der Innensegmentschicht der Photorezeptorzellen (PIS), der äußeren Körnerschicht (Outer nuclear layer (ONL)), der äußeren plexiformen Schicht (outer plexiform layer (OPL)), der inneren Körnerzellschicht (inner nuclear layer (INL)) und der inneren plexiformen Schicht (inner plexiform layer (IPL)) stellt sich reduziert dar (Abbildung 8 A, weißer Punkt, Vergleiche Abbildung 8 D). Die Ganglien-Zell-Schicht (GCL) und die Nervenfaserschicht sind in ihrem Aussehen unstrukturiert (Abbildung 8 A, schwarzer Punkt). Mit fortschreitendem Lebensalter zeigt sich die Bruchsche Membran erhalten (bei Proband 659.02 im Alter von 19 Jahren und Proband 659.04 im Alter von 22 Jahren (Abbildung 8,B,C), während von der Photorezeptorschicht nur die Innensegmente der Photorezeptorzellen und die äußeren Körnerzellschicht stark verändert darstellbar bleiben. Die äußere plexiforme Schicht, die inneren Körnerzellschicht und die innere plexiforme Schicht sind bei zunehmender Reduktion ihrer Dicke kaum noch zu unterscheiden. Die Ganglien-Zell-Schicht (GCL) und die Nervenfaserschicht nehmen ebenfalls an Dicke ab. Zusätzlich zeigt das RPE deutliche Veränderungen in Form irregulärer Reflexe, insbesondere im Bereich des ehemaligen Übergangs zu den Photorezeptoraussensegmenten.

Die schlechte Schichtdifferenzierung liegt möglicherweise zusätzlich an Artefakten auf Grund des ausgeprägten Nystagmus der Patienten. Hauptsächlich ist jedoch die retinale Desorganisation im Rahmen der zunehmenden retinalen Degeneration ursächlich.



### 3. Ergebnisse



**Abbildung 8: Optische Kohärenztomographieaufzeichnungen (OCT) der Patienten**

Die Fundusaufnahme links gibt die Lage des B-Scans an (grüner Balken). A: Patient 659.07 im Alter von 10 Jahren, B: Patient 659.02 im Alter von 19 Jahren, C: Patient 659.04 im Alter von 22 Jahren, D: Normproband  
weißer Pfeil: RPE; schwarzer Pfeil: ELM; weißer Punkt: OPL, INL, IPL; weißer Stern: GCL; GCL: Ganglionzellenschicht; IPL: Innere plexiforme Schicht; INL: Innere Kernschicht; Photorezeptorschichten: OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Kernschicht; ELM: Membrana limitans externa; PIS: Photorezeptorinnensegmente, CC: verbindendes Zilium/ Innensegmentelipsoid; POS: Photorezeptoraußensegmente; RPE: Retinales Pigmentepithel.

Mittels Goldmann-Perimetrie (Haag-Streit, Bern, Schweiz) wurde das kinetische Gesichtsfeld der Patienten durch einführen einer Leuchtmarkierung definierte Größe und Leuchtkraft in das Gesichtsfeld des Patienten bestimmt. Eine Goldmann-Perimetrie konnte bei fünf der Patienten vor dem fünften bis siebten Lebensjahr durchgeführt werden (siehe Tabelle 9: Patient 659.01, 659.02, 659.04, 659.05, 659.07). Dabei zeigt sich eine bei 20° scharf abgrenzbare Gesichtsfeldeinschränkung (Goldmann Marke III/4e). Später reduziert sich dies auf eine zentrale Lichtscheinwahrnehmung mit Abnahme der Sensitivität (Goldmann Marke V/4). Mittels Zweifarbenschwellenperimetrie unter skotopischen und photopischen Bedingungen wurde die Sensitivität der Zapfen und Stäbchen in einer statischen Perimetrie ermittelt. Die Zweifarbenschwellenperimetrie ist eine Methode, die die

### 3. Ergebnisse

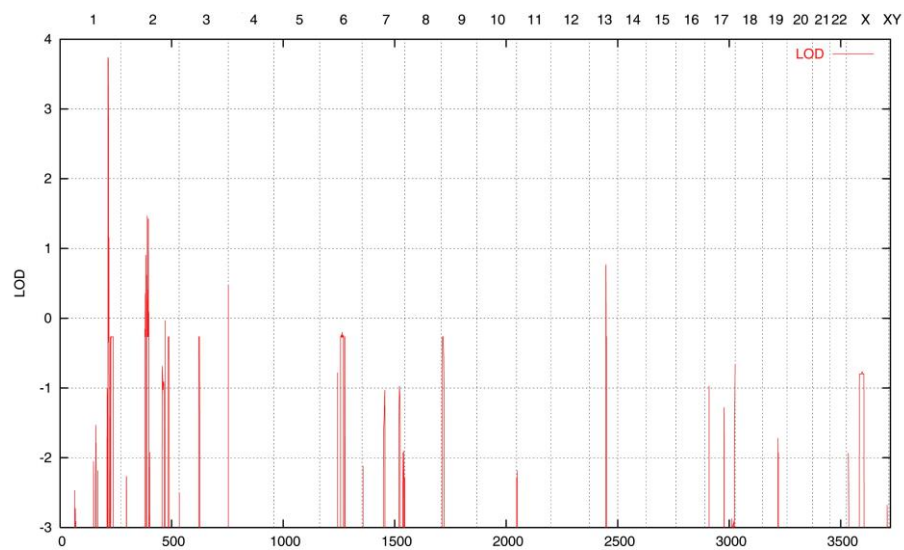
Stäbchen- und Zapfenfunktion ortsauflösend untersucht. Diese Untersuchungstechnik ist in der Lage, die Sensitivität der beiden Photorezeptorsysteme an unterschiedlichen Orten unabhängig voneinander zu vergleichen [118]. In der Zweifarbenschwellenperimetrie zeigt sich bei den drei getesteten Patienten (siehe Tabelle 9: Patient 69.01, 659.05, 659.07) ein massiver Verlust der Sensitivität für blaue Stimuli sowohl unter photopischen als auch unter skotopischen Bedingungen. Die verbliebene Sensitivität wird vermutlich durch die Zapfen vermittelt und lässt sich unter skotopischen Bedingungen bei den älteren Patienten zeigen.

Die zentrale Diagnostik besteht in der Durchführung elektrophysiologischer Diagnoseverfahren, wie dem Ganzfeld-Elektroretinogramm (ERG). Die abgeleiteten Antworten des ERG spiegeln eine Summenantwort der Netzhaut wieder. Beim ERG wird die elektrische Antwort der Netzhaut auf kurze Lichtexposition, photopisch (nach Helladaptation) und skotopisch (nach Dunkeladaptation), mit Hilfe von Elektroden aufgezeichnet. Das Ganzfeld-Elektroretinogramm (ERG) wurde gemäß der gültigen Richtlinien der International Society for Clinical Electrophysiology in Vision (ISCEV) durchgeführt, wobei die durch den starken Nystagmus ausgelösten Artefakte verworfen wurden [94]. Ein Ganzfeld-Elektroretinogramme (ERGs) wurden bei vier Patienten zwischen dem 5. und 10. Lebensjahr aufgezeichnet (siehe Tabelle 9: Patient 659.02, 659.04, 659.05, 659.07) und zeigt sich jeweils unter der Nachweisgrenze. Ein weiteres elektrophysiologisches Verfahren stellt die Ableitung visuell evozierter Potentiale (VEP) dar, die durch Lichtreize ausgelöst werden und mit Hilfe von Elektroden an der Haut des Hinterkopfes abgeleitet werden. Störungen der Sehbahn drücken sich in einer Reduktion der Amplituden bis hin zum völligen Fehlen jeglicher Antwort oder in einer Verlängerung der Latenzzeit der Depolarisation aus[104]. Visuell evozierte Potentiale (VEPs) wurden bei einem Patienten (siehe Tabelle 9: Patient 659.07) im 2. Lebensjahr untersucht. Es waren keine Potentiale auslösbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die phänotypische Ausprägung der Erkrankung einer Zapfen-Stäbchendystrophie entspricht. Die interindividuelle Variabilität der Untersuchungsergebnisse ist sehr stark ausgeprägt. Dies liegt vor allem an den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten, da manche Techniken im Vergleichsalter nicht zur Verfügung standen und später nicht mehr durchführbar waren (z.B. OCT, 2 Farben-Schwellenperimetrie). So können leider keine altersabhängigen speziellen Rückschlüsse auf den Verlauf der Erkrankung in Bezug auf das Alter gezogen werden, weil die Datenlage aufgrund der Anzahl der Patienten nicht ausreichend ist.

### 3.3 Kopplungsanalysen mittels SNP-Micro-Array

Bei acht Personen der Kernfamilie (Family 659.01-06, 659.08-09) erfolgte eine Genotypisierung mit Hilfe des Affymetrix Mapping 50k Xba 240 Array (Affymetrix, High Wycombe, UK) durch das Max Delbrück Center für Molekulare Medizin (Berlin-Buch). Die Typisierungsdaten wurden mit ALOHOMORA aufbereitet und im Anschluss einer parametrischen Kopplungsanalyse (autosomal-rezessiver Erbgang) mittels MERLIN [1] unterzogen. Die parametrische Kopplungsanalyse aus der SNP-Typisierung ergab einen maximalen LOD-Score von 3.627 für eine Kopplung im Bereich des Chromosoms 1 mit einer Kandidatenregion von 21Mb im Bereich 1q31.3 – 1q32.3 (209.473.694 und 214.664.986) (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 9: LOD Score Plot der SNP-Typisierung**

#### **3.4 Eingrenzung der Kandidatenregion mittels Mikrosatellitenmarkern**

Die DNA der vier phänotypisch unauffälligen Verwandten und der an frühkindlicher Netzhautdegeneration Erkrankten (Probanden 659.01-.09), wurde zur Feinkartierung der Kandidatenregion auf Chromosom 1q31-32, die sich aus der vorrausgegangenen Grobkartierung mit dem SNP-Mikroarray (Affymetrix Mapping 50k Xba 240 Array) ergeben hatte, mit Hilfe von Mikrosatelliten Markern herangezogen (7 Tetranukleotidmarker, 12 Dinucleotidmarker siehe Tabelle 6).

Vorraussetzung für die Auswahl der Mikrosatellitenmarker war eine möglichst gleichmäßige Verteilung über die Kandidatenregion (Chromosom 1q31-32) und deren Heterogenität sowie der PIC-Wert (Polymorphic Information Content). Hierbei handelt es sich um einen Maßstab für die Alleldiversität an einem Locus, der für die Schätzung und den Vergleich der Unterscheidungskraft molekularer Marker angewandt wird. Entsprechende Marker wurden mit Hilfe der UniSTS und dbSNP Datenbanken von NCBI (National Center for Biotechnology Information) ausgewählt.

Die Marker wurden hinsichtlich ihrer optimalen Anealingtemperatur getestet (siehe Tabelle 5) und mit Hilfe der PCR unter Standardbedingungen (2 min Denaturierung mit 96 °C, dann 30 Zyklen mit 96 °C Denaturierung über 30 sec.und anschließendem Anealing bei optimaler Anealingtemperatur für 30 sec., zum Schluss über 5 min bei 72 °C die Amplifikation) amplifiziert.

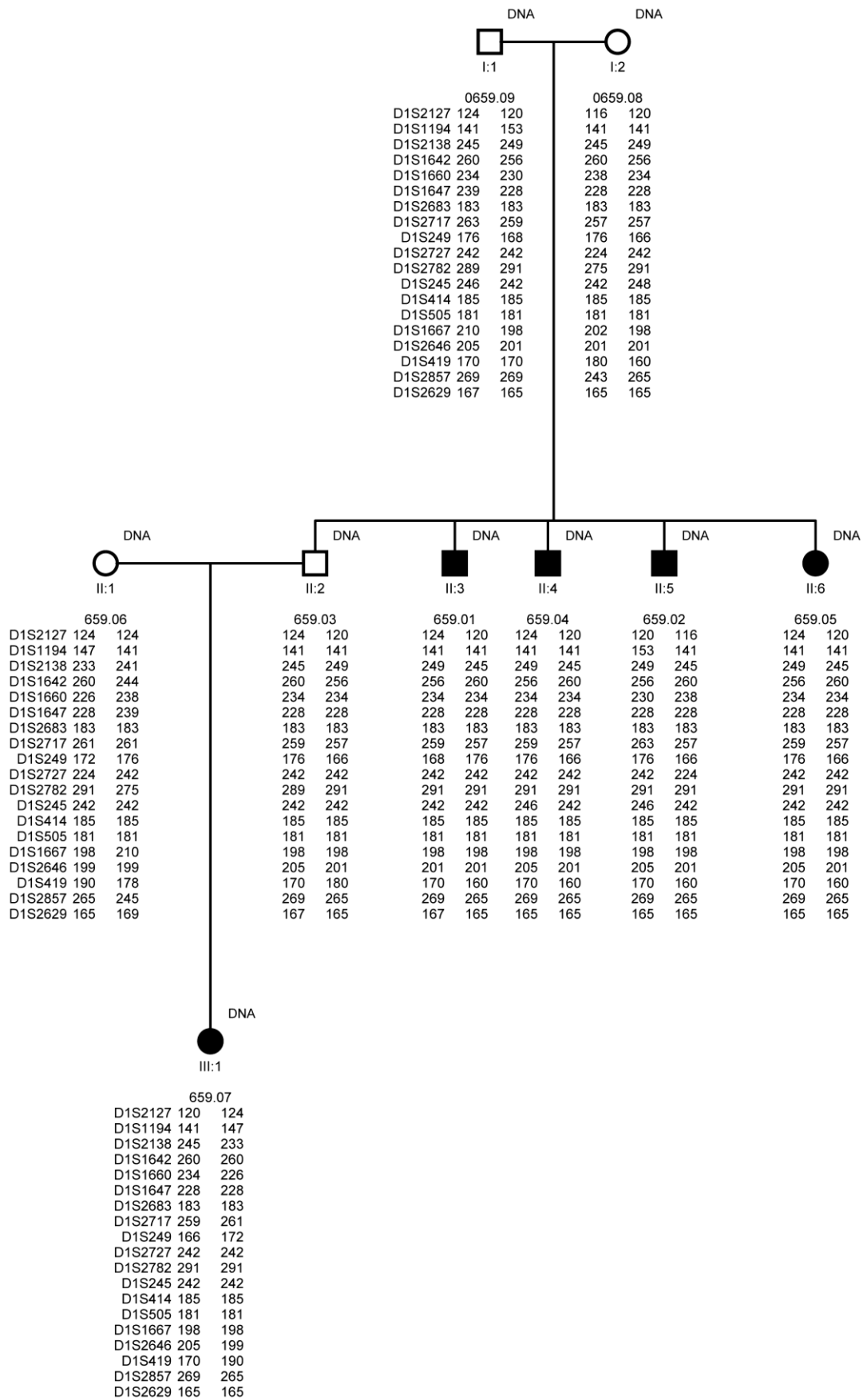
Die PCR-Produkte wurden mit einer 2%igen Agarose (Polyacrylamid)

Gelelektrophorese überprüft und durch Färbung mit Ethidiumbromid visualisiert.

Für jeden Mikrosatellitenmarker wurden im Anschluss für die Patienten 659.01 - 659.09 der Indexfamilie ein PCR-Produkt amplifiziert und mit der Kapillarelektrophorese im QIAxcel-System (Quiagen, Hilden) aufgetrennt. Die Elektropherogramme wurden ausgewertet und als Allele in einen Stammbaum in Cyrillic 2.1.3 (FamilyGenetrix Inc, Oxford, UK) dargestellt (Abbildung 10).

Für die Auswertung der Marker und die weitere Eingrenzung des Kandidatenlocus mit einer parametrischen Kopplungsanalyse durch das Programm MERLIN wurden die 19 Marker anhand der Stammbaumdaten auf 7 informative Marker reduziert (Abbildung 11).

### 3. Ergebnisse



**Abbildung10: Auswertung der Allelverteilung der Mikrosatellitenanalyse**

### 3.5 Kopplungsanalyse mit MERLIN

Um den Bereich weiter einzugrenzen, erfolgte im Anschluss eine parametrische Kopplungsanalyse mit MERLIN unter Berücksichtigung der eingesetzten Mikrosatellitenmarker zur weiteren Differenzierung dieses Bereiches.

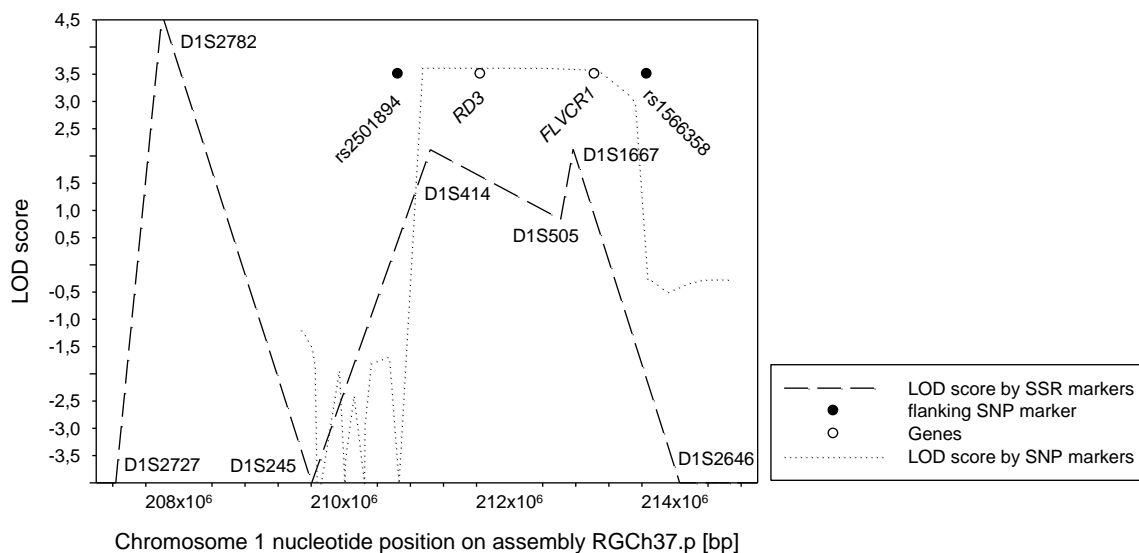
Da es sich bei der Familie 659 um einen komplexen Stammbaum mit Konsanguinität handelt, wurde zur parametrischen Kopplungsanalyse das System MERLIN basierend auf dem Lander-Green-Algorithmus gewählt. Die Parameter wurden wie folgt gesetzt:  
Vererbungsmuster: autosomal-rezessiv

Prävalenz: 1: 100.000

Penetranz: 100%

Position des vermuteten defekten Gens und Allelhäufigkeit der eingesetzten Mikrosatellitenmarker wie in Kapitel 2.9 angegeben.

Mit Hilfe dieser Methoden konnte die Kandidatengenregion auf 10 Mb eingegrenzt werden. Diese Region enthält 138 Gene von denen 10 Gene (OPTC, SOX13, NFS1, NVAK2, PLXNA2, CAMK1G, SYT14, KCNA1, RD3, NENF, NSL1) eine Rolle in der Retina oder im Gehirn spielen.



**Abbildung 11: LOD-Score Plot der Kandidatengenregion (aus [117])**

#### **3.6 Sequenzierung von *RD3***

Aufgrund der Feinkartierung der Kandidatenregion mittels Mikrosatellitenmarkern und anschließender parametrischer Kopplungsanalyse in MERLIN rückte das *RD3*-Gen als mögliches Kandidatengen in den Fokus. Zunächst wurde eine direkte Sequenzierung der beiden Exone des *RD3* nach Sanger im Index-Fall durchgeführt.

Für die Sequenzierung wurden zunächst zwei Primer-Paare, welche das *RD3*-Gens in den Intronen flankieren mittels der in GenBank hinterlegten genomischen Sequenz (NT\_021877) über Vector NTI (V.11, Invitrogen) definiert. Die beiden Fragmente von *RD3* wurden mittels der definierten Primer für den Indexpatienten (659.01) mittels PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und aus der Agarose mittels Zentrifugation über eine Genaxxon Säule extrahiert. Die PCR-Produkte beider Exone wurden auf dem kodierenden und dem nicht-kodierenden Strang mit dem Sanger-Verfahren durch einen kommerziellen Sequenzierungsanbieter (Seqlab, Göttingen) sequenziert.

Im Anschluss wurden die Sequenzen unter zu Hilfenahme der GENTle software (Magnus Manske) mit der Wildtyp-Sequenz in der GenBank (NG\_013042) verglichen. Die Sequenzierung des *RD3* in dem Indexpatienten ergab eine homozygote nonsense Mutation im Codon p.Y60\* (c.180C>A). Die Mutation konnte im nächsten Schritt bei allen erkrankten Familienmitgliedern ebenfalls im homozygoten Zustand nachgewiesen werden. Die Eltern der Patienten erwiesen sich als heterozygote Träger des mutierten Allels.

### **4. Diskussion**

Ziel dieser Arbeit war es, die Ursache der frühkindlichen Netzhautdystrophie in einer konsanguinen kurdischen Familie (659) zu identifizieren. Die Kernfamilie bestand aus neun Personen, von denen fünf an einer frühkindlichen Netzhautdystrophie erkrankt waren. Die Phänotypen dieser fünf Patienten konnten zwischen 1989 und 2010 im Alter von 3 Monaten bis 22 Jahren in der Augenklinik der Universitätsklinik in Gießen verfolgt werden.

Die Ergebnisse zeigten, dass bei dieser Form der frühkindlichen Netzhautdegeneration sowohl die Stäbchen als auch die Zapfen degenerieren, was klinisch mit ausgeprägter Nachtblindheit, einem deutlich eingeschränkten Gesichtsfeld, einer schweren Visusminderung, einem ausgeprägten Nystagmus, einer erhöhten Blendempfindlichkeit und einem ERG einhergeht, das bereits kongenital unter der Nachweisgrenze bleibt. Nachdem potentielle LCA Kandidaten Gene (*RetGC1*, *RPE65*, *LRAT*, *AIPL1*, *CRX*, *CRB1*, *CEP290*, *RPGRIP*, *TULP1* und *GUCY2D*) ausgeschlossen worden waren, wurde die Familie einer Kopplungsanalyse mit Feinkartierung unterzogen. Die Kopplungsanalysen wurden mittels Affymetrix SNP-Arrays und die Feinkartierung mittels Mikrosatellitenmarkern durchgeführt.

Durch die Kopplungsanalysen konnte der Locus zunächst auf dem Chromosom 1q31-32 eingegrenzt werden, in dessen Bereich das Kandidatengen *RD3* lokalisiert ist. Die Sequenzierung des *RD3*-Gens identifizierte eine nonsense Mutation (p.Y60X (c.180C>A)), die in allen an frühkindlicher Netzhautdegeneration erkrankten Familienmitgliedern homozygot vorliegt. Die Mutation befindet sich im Bereich des ersten Exons und führt zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation durch ein neu entstandenes Stop-Codon. Ein Abbau der mRNA aufgrund von nonsense-mediated decay (NMD) vor Beginn der Translation ist wahrscheinlich [27]. Selbst wenn eine Translation der mRNA stattfindet ist das Genprodukt so verkürzt, dass die Funktion des Proteins deutlich eingeschränkt wird bzw. ein Funktionsverlust resultiert.

#### **4.1 Bewertung der Kopplungsanalyse und anderer verwendeter Methoden in der vorliegenden Arbeit**

Die Durchführung einer Kopplungsanalyse zur Identifikation homozygoter Bereiche im Genom bot sich bei dieser Familie an, da diese konsanguin war und es sich nach Analyse des Stammbaumes um einen autosomal rezessiven Erbgang bezüglich des Gendefektes handeln musste. Zusätzlich erstreckte sich der Stammbaum über 3 Generationen wobei in der 2.Generation neben 4 betroffenen Familienmitgliedern ein gesundes Familienmitglied die Möglichkeit zur Gegenprobe gab. Die



Kopplungsanalyse erzielt optimale Aussagen, wenn eine große Anzahl von Rekombinationsvorgängen (Meiosen), wie in diesem Fall, vorliegen. Mit neun Familienmitgliedern und daraus resultierenden Meiosen konnte eine gute statistische Sicherheit gewährleistet werden.

Ein Nachteil der initial angewendeten Affymetrix SNP-Array Kopplungsanalyse ist, dass bei konsanguinen Familien, wie bei Familie 659 über das gesamte Genom gehäufte SNPs in homozygoter Form vorliegen können und somit die Aussagekraft der Analyse eingeschränkt sein kann. Die Auswertung des Affymetrix SNP-Array detektierte in Familie 659 einen deutlichen Hotspot auf Chromosom 1. Der homozygote Bereich von 21 Mb im Bereich 1q31.3 – 1q32.3 war zunächst für eine sich direkt anschließende Kandidatengenanalyse zu groß, sodass eine Feinkartierung mittels Mikrosatellitenmarkern angeschlossen wurde. Der Vorteil der Mikrosatellitenmarker im Gegensatz zu SNPs liegt in der spezifischeren Aussagekraft bei konsanguinen Familienstammbäumen, da die Mikrosatellitenmarker mehr als ein Allel ausbilden können, was zu einer klareren Aussage bezüglich der Segregation der Marker in der Kandidatenregion führen kann.

Zum Zeitpunkt der Laborarbeiten stand das inzwischen in der Regel angewendete Verfahren des whole genome screening (WGS), in dem ein Homozygotiemapping von Einzelpatienten erfolgt, noch nicht in dem Rahmen wie zur jetzigen Zeit zur Verfügung. Die Auswertung der in der Feinkartierung identifizierten Allele jedes Einzelpatienten der Familie 659 in Cyrillic 2.1 erfolgte zur Gewinnung eines Überblickes über den untersuchten Bereich der Mikrosatellitenmarker sowie zur Identifizierung von Fehlanalysen, welche eine Wiederholung notwendig machten.

Die anschließende Kopplungsanalyse mit MERLIN unter Berücksichtigung der verwendeten Mikrosatellitenmarker diente der statistischen Beschreibung und weiteren Eingrenzung des relevanten Bereiches. In dem sich aus dieser Analyse ergebenden Bereich wurde *RD3* als wahrscheinlichstes Kandidatengen identifiziert und eine Sequenzierung angeschlossen, welche eine homozygote nonsense Mutation im Codon p.Y60\* (c.180C>A) bei allen phänotypisch auffälligen Familienmitgliedern ergab.

#### **4.2 Das *RD3*-Gen**

*RD3* (C1orf36 (Chromosome 1 open reading frame 36)) wurde erstmals im Jahre 2003 als mögliches Kandidatengen für frühkindliche Netzhautdystrophien beschrieben. Im Jahre 2006 nach Identifizierung der cDNA, wurde das Transkript von *RD3* (C1orf36) rekonstruiert [83],[49]. Dabei zeigte sich, dass *RD3* für ein 195 Aminosäuren großes Protein kodiert, auf Chromosom 1q32.3 liegt und aus 3 Exonen besteht.

### 4.3 Tiermodelle

#### 4.3.1 Natürliche Tiermodelle – die *rd3* Maus

Im Schweizer Kanton Graubünden wurden 1969 Mäuse gefangen, die an einer hereditären Netzhautdystrophie mit autosomal-rezessiver Vererbung litten [25]. Auf Grund ihrer Fellfarbe wurden sie zunächst als „tobacco mice“ bezeichnet. [49] Mit Hilfe der Kopplungsanalyse wurde die Lokalisation des für die Erkrankung ursächlichen Gens zunächst auf einen 5 cM großen Bereich auf dem murinen Chromosom 1 eingegrenzt [25] und nach weiteren Vorarbeiten [34] wurde der exakte Genlocus (3322402L07Rik) von *Rd3* identifiziert [49]. Die Sequenzierung von *Rd3* wies die krankheitsverursachende Mutation, welche an Position 319 in Exon 3 des Gens zu einem Austausch von Cytosin gegen Thymin und somit zu einem veränderten Codon 107 führt, nach. Hierdurch kommt es bei der Translation dazu, dass an dieser Stelle statt dem physiologischerweise dort eingebauten Arginin nun ein Stoppcodon entsteht. Dadurch kommt es zu einem Abbruch der Proteinbiosynthese nach Position 106 und somit zu einer Verkürzung des eigentlich 195 Aminosäuren großen Proteins. In Experimenten bei denen in COS1-Zellen, dieses verkleinerte und dysfunktionale *Rd3*-Protein exprimiert wurde, zeigte es sich instabil und wurde schnell abgebaut. [49] Bei den *rd3*-Mäusen vollzieht sich die Entwicklung der Retina in den ersten beiden Lebenswochen wie bei den Wildtyp-Mäusen. Ab der dritten Lebenswoche kommt es jedoch zu einer progredienten Reduktion der äußeren Körnerschicht (ONL) der inneren plexiformen Schicht (PIS) und dem Außensegment der Photorezeptorzellen (POS) bis hin zum kompletten Verlust aller Photorezeptoren in der 7. oder 8. postnatalen Woche [25,62].

Parallel zu dieser Photorezeptorzelldegeneration lassen sich im Elektroretinogramm eine Abnahme der Amplituden unter die Nachweisgrenze messen sowie degenerative Veränderungen am Fundus beobachten [25,62].

Diese histologischen und funktionellen Veränderungen in der Retina der Maus sind in der Fundoskopie mit engen Gefäßen und hypopigmentierten Arealen, welche sich im Verlauf in hyperpigmentierte Areale umwandelten, vergesellschaftet.

In nachfolgenden Untersuchungen fiel auf, dass die histologischen und elektrophysiologischen Befunde nicht bei allen *rd3*-Mäusen identisch waren, sondern zwischen verschiedenen durch Zucht entstandenen Unterstämmen variierten [49,63,87].

Die im Folgenden durchgeführten Vergleiche zwischen zwei Mausstämmen ((BALBc-*rd3/rd3* (weiße Maus) bzw. B16/a-*rd3/rd3* (schwarze Maus)) zeigten, dass deren unterschiedlicher genetischer Hintergrund Einfluss auf die phänotypische Entwicklung der Netzhautdegeneration hat [49,63,87].

Für beide Stämme wurden Linien gezüchtet, deren Individuen jeweils homozygote Träger für *Rd3* waren (BALBc-*rd3/rd3* bzw. Bl6/a-*rd3/rd3*). Trotz identischem *Rd3*-Gen Status ließ sich durch histologische Vergleiche der Dicke der äußeren Körnerschicht (als Ausdruck des Überlebens der Photorezeptorzellen) im Alter von 5 bis 12 Wochen nachweisen, dass die retinale Degeneration bei den BALBc-*rd3/rd3*-Mäusen im Vergleich zu den Bl6/a-*rd3/rd3*-Mäusen schneller voranschreitet [49,63,87].

Die Suche nach Bereichen innerhalb des Maus-Genoms, in denen sich Gene befinden, welche für die gefundene phänotypische Variabilität in Bezug auf die Geschwindigkeit der retinalen Degeneration verantwortlich sein könnten (sog. QTLs = quantitative trait loci), ergab Regionen auf den Chromosomen 5, 8, 14 und 17. Eine Charakterisierung konkreter Gene innerhalb dieser vermuteten Abschnitte steht derzeit noch aus [35]. Diese Untersuchungsergebnisse könnten Hinweis darauf sein, dass auch bei humanen *RD3*- Mutationen weitere Gene Einfluss auf die phänotypische Ausprägung und damit beispielsweise auf die Geschwindigkeit der retinalen Degeneration haben könnten. Hierzu besteht zukünftig weiterer Forschungsbedarf.

#### **4.3.2 Natürliche Tiermodelle - das Hundemodell der *rcd2* Collies (Rod-cone dysplasia type 2)**

Auch bei verschiedenen Hunderassen ist eine Vielzahl erblicher Netzhautdegenerationen bekannt. [6,76,77,122,148] Besonders interessant ist hierbei die Stäbchen-Zapfen-Dysplasie Typ 2 (Rod-cone dysplasia type 2 = *rcd2*), eine autosomal rezessive Erbkrankheit bei lang- und kurzhaarigen Collies.[76,147]

Das klinische Bild der betroffenen Collie-Welpen wurde bereits 1979 als eine mit ca. sechs Wochen auftretende ausgeprägte Nachtblindheit beschrieben, die bis zu einem Alter von sechs bis acht Monaten zum vollständigen Visusverlust führt. [147]

Im Elektroretinogramm unter skotopischen und photopischen Bedingungen der untersuchten Hunde mit *rcd2* fielen bereits nach 16 Wochen deutlich reduzierte Amplituden auf. [148]

In Kreuzungsexperimenten konnte bewiesen werden, dass es sich bei *rcd2* um eine eigenständige Krankheitsentität mit einem dazugehörigen Gendefekt handelt [6].

In mehreren Untersuchungen konnte das für *rcd2* verantwortliche Gen auf Chromosom 7 des Hundes eingegrenzt werden [77] und im weiteren Verlauf durch Kopplungsanalysen auf drei mögliche Kandidatengene beschränkt werden: *TRAF5*, *C1orf36* und *SLC30A1*. Letztendlich erwies sich das *C1orf36*-Gen als verantwortlich für die Erkrankung der Stäbchen-Zapfen-Dysplasie Typ 2 (*rcd2*) bei Collies.

Als ursächliche Mutation konnte eine Insertion von 22 Basenpaaren identifiziert werden, welche zu einer Verschiebung des Leserasters und damit zur Synthese eines in seiner Funktion beeinträchtigten Proteins führt.

Auch im *rcd2* Hundemodell, wird ähnlich wie bei den Mäusen, ein sehr früher Erkrankungsbeginn beschrieben [6,76,148].

Die Stäbchen Antwort im ERG sinkt bei *rcd2* Collies bereits sehr früh, um die siebte postnatale Woche und zu Beginn der retinalen Degeneration, unter die Nachweisgrenze. Dabei bleibt die Zapfenantwort zunächst normal bis minimal in Amplitude und Latenz verändert [6,122].

Histologisch zeigen die Zapfen ein keulenförmig verändertes Innensegment und ein desorganisiertes Außensegment. Im Vergleich zur äußeren plexiformen Schicht und zur Ganglien Zellschicht scheint die Photorezeptorzellschicht sehr viel stärker durch die Degeneration verändert [122]. Außerdem wiesen biochemische Untersuchungen eine erhöhte Konzentration an cGMP in den Photorezeptorzellen nach [148].

#### **4.4 Humane RD3 Mutationen**

Im Jahre 2006 wurden erstmals Patienten mit einer degenerativen Netzhauterkrankung beschrieben, denen eine Mutation im *RD3*-Gen zu Grunde lag. [49] Im Rahmen eines großangelegten Mutationsscreenings wurden damals zwei Geschwister indischer Abstammung identifiziert, deren homozygote Mutation (c.296+1G→A) mit dem Auftreten der frühkindlichen Netzhautdystrophie bei beiden Betroffenen einherging, während sich die heterozygoten Träger innerhalb dieser Familie phänotypisch unauffällig präsentierten. Sie stellen die weltweit ersten an frühkindlicher Netzhautdystrophie erkrankten Patienten mit ursächlicher *RD3* Mutation dar, die beschrieben wurden. [49]

Bei der Mutation im *RD3* Gen der indischen Familie handelte es sich um eine homozygote splice-site-Mutation, welche zu einem vorzeitigen Stop-Codon führt. Die Veränderung der Basensequenz führt, wie auch bei unserer Familie 659, über die Entstehung eines Stoppcodons zum vorzeitigen Abbruch der Proteinbiosynthese durch nonsense-mediated decay (NMD) vor Beginn der Translation [27][49].

Durch Perrault und Kollegen wurden im Jahre 2013 weitere Patienten mit *RD3* Mutationen beschrieben. Bei einer großangelegten Screening Untersuchung von weltweit 852 an frühkindlicher Netzhautdegeneration erkrankten Patienten, wurden 3 weitere *RD3*- Mutationen in sieben miteinander nicht verwandten konsanguinen Familien identifiziert. Bei den gefundenen *RD3*-Mutationen handelt es sich zweimal, wie auch bei unserer Familie 659 (c.180C>A p.Y60\*), um nonsense Mutationen

(p.R38\* (c.112C>T), p.E46\* (c.136G>T)) und einmal um eine 2bp Deletion (c.137\_138delAG (p.E46Afs83\*)) [112].

Zusammenfassend lässt sich auf Grund der aktuellen Datenlage sagen, dass es sich bei Patienten mit *RD3*- Mutationen um eine kleine Gruppe innerhalb der Patienten mit frühkindlicher Netzhautdystrophie handelt und die Prävalenz in der Gesamtbevölkerung gering ist, da in großangelegten Screening Untersuchungen nur wenige Patienten mit *RD3*- Mutationen identifiziert wurden und insgesamt in der Literatur wenige humane *RD3*- Mutationen beschrieben werden (9 Familien inklusive der hier untersuchten Familie 659). Das Risiko für *RD3*-Mutationen scheint jedoch vor allem in Familien mit mediterranem Ursprung und bestehender Konsanguinität erhöht und steigt bei bereits bekannten Erkrankungsfällen in der Familie. Auch *GUCY2D*- Mutationen treten gehäuft in Familien mit mediterranem Ursprung auf [57-59], wohingegen z.B. *CEP90*-Mutationen in Nordafrika selten vorkommen [2,111]. Dieses Wissen könnte zukünftig die molekulargenetische Diagnostik vereinfachen, indem Patienten mit frühkindlicher Netzhautdystrophie die einen mediterranen Hintergrund besitzen und die klinisch keine Hyperopie aufweisen und in deren familiärem Umfeld Patienten mit frühkindlicher Netzhautdystrophie aufgetreten sind, initial auf *RD3*- Mutationen untersucht werden [58,111].

#### **4.5 Physiologie des *RD3*-Proteins**

Die physiologische Funktion des intakten Genproduktes von *RD3* spielt eine wichtige Rolle beim intrazellulären Transport der retinalen Guanylatzyklase sowie bei der Regulation ihrer Aktivität. [10,116]

*RD3* unterdrückt die Aktivität der retinalen Guanylatzyklase in den Stäbchen und den Zapfen in Abwesenheit der Guanylatzyklase aktivierenden Proteine (GCAP1 und GCAP2) und vermittelt den Transport vom Innen- in das Außensegment [10].

Durch immunhistochemische Färbung von Netzhautschnitten gesunder Mäuse mit *RD3* spezifischen Antikörpern ließ sich zeigen, dass das *RD3*-Protein physiologisch im Außensegment der Photorezeptoren, jedoch kaum im Innensegment und im Synapsenbereich zu finden ist. [116] Zu dem gleichen Ergebnis kamen Versuche, welche das Vorkommen des *RD3*-Proteins im Außensegment mittels Massenspektrometrie basierter Proteomanalyse untersuchten [78].

Experimente, bei denen eine Lösung verschiedener retinaler Proteine durch eine mit *RD3* Antikörpern markierte Lösung geschleust und anschließend eine Analyse des Präzipitats mittels Massenspektrometrie und Westernblot durchgeführt wurden, zeigten eine gemeinsame Ausfällung von RetGC1/RetGC2 und *RD3* [10]. Diese Ergebnisse legen eine Interaktion des Genproduktes von *RD3* mit dem Genprodukt von *GUCY2D*

(RetGC1) nahe [10,116]. In der Koexpression verschiedener *GUCY2D*-Mutanten zusammen mit *RD3* in HEK293T-Zellen zeigten, dass eine kurze C-terminale Domäne von RetGC1 für die Bindung an das RD3-Protein zuständig ist. [10]

Während bei sogenannten rd3-Mäusen (Mausmutanten ohne funktionsfähiges RD3-Protein) RetGC1 und RetGC2 immunhistochemisch in den Außensegmenten der Photorezeptorzellen fehlten, konnten diese bei gesunden Mäusen nachgewiesen werden [3-5]. Auch mit Hilfe von Westernblots aus Retinaextrakten bestätigte sich, dass die Abwesenheit von RD3 (bei rd3-Mäusen) zu einem Mangel an RetGC im Außensegment der Photorezeptorzellen führt, während das mittels PCR nachgewiesene Expressionsniveau von RetGC1 bei Wildtyp- und rd3 Mäusen ähnlich ist. [10] Somit ist das Fehlen von RetGC1 im Außensegment bei RD3-Mangel auf eine Störung der Interaktion der beiden Proteine zurückzuführen. [10]

Expressionsanalysen von *RD3* und *GUCY2D* in COS7-Zellen zeigten, dass bei separater Expression von *RD3* dieses in intrazellulären Vesikeln (Endosomen) (Kokalisation mit Rab11, einem Vesikel-Marker) nachzuweisen ist und RetGC1 separat exprimiert im endoplasmatischen Retikulum des Innensegmentes vorkommt (Kokalisation mit Kalnexin, einem ER-Marker) [10,49]. Bei gemeinsamer Expression beider Proteine wird RetGC1 vom endoplasmatischen Retikulum in die RD3 enthaltenden Vesikel überführt. Diese Ergebnisse legen eine Mitbeteiligung des RD3-Proteins am Export von RetGC1 aus dem endoplasmatischen Retikulum in die Vesikel nahe sowie an deren Transport ins Außensegment [10].

Aufgrund des experimentellen Nachweises einer nichtkompetitiven Hemmung der enzymatischen Basisaktivität der Guanylatzyklase in Abwesenheit von GCAPs sowie einer kompetitiven Hemmung der RetGC-Aktivität bei niedrigem Kalziumspiegel, ist davon auszugehen, dass das RD3-Protein für die Hemmung der basalen Aktivität der Guanylatzyklase verantwortlich ist. [116] Vermutlich inhibiert RD3 die RetGC Funktion bei niedrigen Kalziumkonzentrationen. Es antagonisiert vermutlich die GCAP Funktion jedoch ohne die Kalziumsensitivität von GCAP oder RetGC zu beeinflussen [116].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass RD3 die cGMP Synthese durch die RetGC auf eine niedrige cGMP Konzentration reguliert, sodass die cGMP-Konzentration in den Photorezeptorzellen nicht übermäßig ansteigt.

#### **4.6 Pathophysiologie des RD3-Proteins**

Ein Fehlen von RD3 verhindert den Transport von RetGC ins Außensegment und führt durch die fehlende Hemmung der RetGC im Innensegment zu einer unkontrollierten cGMP-Synthese im Innensegment. Zu dieser Vorstellung passt auch, dass in früheren

Studien bei rd3-Mausmodellen und bei rcd2-Collies erhöhte intrazelluläre cGMP-Spiegel gemessen werden konnten [148].

Neben dem Transport hemmt RD3 zusätzlich wie oben beschrieben die enzymatische Aktivität der Guanylatzyklase während ihrer Reifung im Innensegment und ihrem Transport vom Innen- in das Außensegment. Dies verhindert, dass es durch die Basisaktivität der Guanylatzyklase zu einer Produktion von cGMP im Innensegment kommt, welches nicht durch die eigentlich dafür verantwortliche Phosphodiesterase (die sich im Außensegment befindet) abgebaut werden kann [116].

Zusammenfassend kann man sagen, dass bei *RD3* Mutationen das eigentlich funktionstüchtige RetGC durch die gestörte Transportfunktion des RD3 nicht an seinen Wirkort im Außensegment der Photorezeptorzellen gelangt, was einem Fehlen von RetGC bei *GUCY2D* Mutationen gleichkommt. Überträgt man also diese Befunde vom Mausmodell (rd3- und GC(1/2) double knockout-Mäusen) auf den Menschen, erklärt dies die bestehenden phänotypischen Ähnlichkeiten mit frühem und ausgeprägtem Visusverlust, träger Pupillenreaktion und Nystagmus bei Patienten mit *GUCY2D*- und *RD3*-Mutationen [10].

Die aus beiden Mutationen *RD3* und *GUCY2D* resultierende gestörte Kalziumhomöostase (verminderte intrazelluläre Kalziumkonzentration in Folge des Mangels an Guanylatzyklase im Außensegment damit erniedrigtem cGMP-Spiegel und Reduktion der Leitfähigkeit der cGMP-gesteuerten Kationenkanäle in der Zellmembran) könnte eine Erklärung dafür sein, dass es bei beiden Mutationen nicht nur zu einer gestörten Funktion der Photorezeptoren kommt, sondern auch zu einer progredienten retinalen Degeneration [10].

#### **4.7 Phänotypische Ausprägung der humanen *RD3* Mutation**

Der Phänotyp der Betroffenen der Familie 659 ähnelt dem Phänotyp in den Tiermodellen, wie auch dem, der für die indischen und die durch Perrault und Koautoren beschriebenen Patienten mit *RD3* Mutation [49].

Bezüglich der indischen Patienten sind die klinischen Angaben rudimentär. Perrault und Koautoren (2013) beschreiben den Phänotyp ihrer Patienten mit *RD3* Mutation etwas detaillierter mit starker Visusminderung, fehlender Blickverfolgung, Nystagmus seit der Geburt, träger Pupillenreaktion, abnormer Makulapigmentierung und -atrophie, Rarifizierung der Gefäße, teilweise bestehendem Keratokonus, Depigmentierungen der Retina, Knochenbälkchen in der Peripherie sowie Atrophie des RPE.

Die Träger der *RD3*-Mutation in der vorliegenden Arbeit zeigten von Geburt an eine träge Pupillenreaktion und eine sehr starke Einschränkung des Visus, die über Fingerzählen, Handbewegungen oder Lichtscheinwahrnehmung nicht hinausging.

Daraus resultierten der ausgeprägte Nystagmus und das Fehlen der Blickverfolgung. Der stark reduzierte Visus und der Nystagmus führte dazu, dass Prüfungen des Farbsehens oder perimetrische Untersuchungen nicht oder nur in sehr geringem Umfang durchführbar waren.

Die Funduskopie zeigte über den gesamten Fundus eine stumpfe Retina mit hyper- und hypopigmentierten Arealen (Knochenbälkchen in der Peripherie), schmale Gefäße und atrophische Läsionen der Makula (siehe Tabelle 9). Die morphologischen und funktionellen Daten machen deutlich, dass es sich bei der Erkrankung um eine globale und schwere Netzhautdegeneration handelt, die bereits in den ersten Lebensjahren soweit fortgeschritten ist, dass eine Progression funktionell nur noch bedingt dargestellt werden kann.

In der optischen Kohärenztomographie (OCT) offenbart sich die Desorganisation aller retinaler Schichten mit Abnahme der retinalen Gesamtdicke, inklusive der Ganglienzellschicht und Nervenfaserschicht im späteren Krankheitsverlauf. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Ergebnissen der Tiermodelle [25,122]. In dieser Arbeit konnten nur von 3 Patienten (659.02, 659.04 und 659.07) rückblickend OCT-Daten verglichen werden. Die bei Perrault und Koautoren [112] berichteten OCT-Daten zu einem Patienten, dessen Alter ungenannt blieb, schildert eine Atrophie des RPE. Dies stimmt mit dem Untersuchungsergebniss der hier beschriebenen Patienten 659.02 und 659.04 im Alter von 19 und 22 Jahren überein. Auch dort wurde bei der Untersuchung zu Beginn der 3. Lebensdekade eine Atrophie des RPE nachgewiesen, wohingegen die OCT-Daten von Patient 659.07 im Alter von 10 Jahren eine Reduktion der Retinadicke jedoch noch keine eindeutige Atrophie des RPE zeigen konnte. Daten zur indischen Familie oder den anderen Patienten welche durch Perrault und Koautoren [112] identifiziert wurden existieren bezüglich der Morphologie der Retina leider nicht, sodass keine allgemeingültigen Aussagen, auf Grund der zu geringen Stichprobe zu treffen sind. Bezüglich genauerer Beobachtungen der morphologischen Veränderungen der Retina in Abhängigkeit vom Patientenalter besteht in der Zukunft weiterer Forschungsbedarf, wobei die Erhebung der Daten aufgrund der erkrankungsbedingten Erschwernisse den möglichen Aufwand einer Routineuntersuchung schnell übersteigt.

Vergleicht man die in der Literatur angegebenen Ergebnisse der Tierexperimente mit denen bei uns erhobenen phänotypischen Daten zeigt sich, dass der Beginn der retinalen Degeneration beim Menschen mittels Fundoskopie in der ersten Lebensdekade detektiert wurde und im Verlauf bei 3 Patienten mittels OCT näher beschrieben werden konnte. Der frühe Beginn lässt sich auch bei rd3-Mäusen (Lebenserwartung 2 - 3 Jahre) ab der dritten Lebenswoche und bei den rcd2-Collis



(Lebenserwartung 14 - 16 Jahre) mit Beginn der 7. postnatalen Woche mit einer verminderten Stäbchenantwort im ERG und in der 16. Woche einem erloschenen ERG nachweisen [25,122]. Im Menschen wie auch in den Tiermodellen lässt sich eine Progression bis zum vollständigen Visusverlust detektieren. Der Visus der Patienten betrug maximal 0,08 (LogMAR <1.12) mittels Teller Acuity Cards und 0,05 (logMAR 1.3) mittels E-Haken und nahm bis zu Beginn der 2. Lebensdekade bis auf Lichtwahrnehmung gepaart mit zunehmenden Fundusveränderungen ab. Bei den rcd2 Collis trat im sechsten bis achten Lebensmonat ein vollständiger Visuverlust auf und bei den rd3-Mäusen kam es zum vollständigen Verlust der Photorezeptorzellen zwischen der dritten und achten postnatalen Woche [25,122]. Die in der Retina betroffenen Zellarten lassen sich auf Grund der bereits erwähnten unvollständigen Datenlage beim Menschen nur schlecht miteinander vergleichen. Histologisch waren in den Retina der rcd2 Collis bei den Zapfen ein verdicktes Innensegment und eine desorganisiertes und degeneriertes Außensegment nachweisbar, während die Ganglienzellschichten sich von der Degeneration weniger betroffen zeigten. Bei den rd3-Mäusen ließ sich eine progrediente Degeneration der Retina ab der dritten Lebenswoche mit Reduktion der äußeren Körnerzellschicht, der inneren plexiformen Schicht sowie ein kompletter Verlust von Außen- und Innensegment der Photorezeptorzellen bis zur siebten oder achten postnatalen Woche detektieren [25,122]. Dies lässt sich mit den Ergebnissen unserer Patienten vergleichen, bei denen im OCT eine Abnahme der Retinadicke sowie im Verlauf ein Fehlen des Außensegments der Photorezeptorzellen und des retinalen Pigmentepithel zu detektieren war. Das Innensegment der Photorezeptorzellen sowie die Bruchsche Membran blieben erhalten, jedoch in ihrer Dicke ebenso wie die äußere Körnerzellschicht (Outer nuclear layer (ONL)), die äußeren plexiformen Schicht (outer plexiform layer (OPL)), die innere Körnerzellschicht (inner nuclear layer (INL)) und die innere plexiforme Schicht (inner plexiform layer (IPL)) reduziert. Die Ganglien-Zell-Schicht (GCL) und die Nervenfaserschicht waren in ihrem Aussehen unstrukturiert.

#### ***4.8 Phänotypischer Vergleich von RD3 und GUCY2D bedingter frühkindlicher Netzhautdegeneration***

In dieser Studie führt die nonsense Mutation im *RD3*-Gen zu einem kompletten Verlust der Funktion von RD3. Die Visusminderung ist vergleichbar mit Patienten mit *GUCY2D*-Mutationen (fehlender Transport der RetGC durch RD3 ins Außensegment) und entsprechen den phänotypischen Ausprägungen der anderen in der Literatur beschriebenen Patientin mit Mutation im *RD3*-Gen [49,112].

In Tiermodellstudien wurde nachgewiesen, dass es einen Unterschied in der Geschwindigkeit der Photorezeptorzelldegeneration zwischen den rd3-Mäusen und den RetGC1 double knockout Mäusen gibt. Die retinale Degeneration zeigte sich bei den rd3 Mäusen wesentlich stärker progredient. [26] Dies spiegelt sich auch in den humanen phänotypischen Ergebnissen wieder. Im Gegensatz zu den Befunden bei *GUCY2D* Patienten kommt es bei Mutationen im *RD3*-Gen zu früheren und schweren Störungen im Aufbau der Retina (siehe Abbildung 8). Diese Veränderungen betreffen insbesondere die Schichten der Außen- und Innensegmente sowie die dazwischenliegenden Verbindungszilien und lassen sich mit histologischen Ergebnissen von rd3-Mäusen vergleichen [35,122].

Funktionell lässt sich also im Vergleich des Phänotypes (Visusbestimmung) von *GUCY2D* und *RD3*- Mutationen kein aussagekräftiger Unterschied feststellen, da bei beiden Patientengruppen der Visus massiv eingeschränkt ist. Morphologisch lassen sich jedoch Unterschiede detektieren, so finden sich bei *GUCY2D* Patienten erst in der 2. Lebensdekade Fundusauffälligkeiten, wohingegen bei den Patienten aus dieser Arbeit (Familie 659) mit *RD3* Mutationen (siehe Tabelle 9) bereits in der ersten Lebensdekade Fundusveränderungen zu detektieren waren.

Der Grund für den frühen Beginn des degenerativen Prozesses mit fortschreitender Visusverschlechterung bei den von *RD3* Mutationen Betroffenen, im Vergleich zur weniger ausgeprägten frühen Degeneration bei den *GUCY2D* Mutationen mit gleichbleibend schlechtem Visus mit geringerer Progression, liegt möglicherweise an der erhöhten cGMP-Konzentration in den Innensegmenten der Photorezeptorzellen, die dort degenerativ auf die Photorezeptoren wirkt. Dies entsteht aufgrund des Funktionsverlustes von RD3, wodurch die RetGC1 im Photorezeptorinnensegment verbleibt und aufgrund ihrer basalen Aktivität dort weiterhin cGMP produziert, das dort nicht ausreichend abgebaut werden kann. In den Photorezeptoraußensegmenten findet sich außerdem eine reduzierte RetCG1-Aktivität, die zu einer frühen Einschränkung der Photorezeptorfunktion führt.

Bei Mutationen im *GUCY2D*-Gen und damit einem Funktionsverlust der RetGC1, ist die Produktion von cGMP im gesamten Photorezeptor vermindert, was weniger schädlich zu sein scheint als eine gesteigerte cGMP Konzentration im Innensegment mit anschließend anhaltende verminderter Kalziumkonzentration.

Die morphologischen Unterschiede in der Retina zwischen *GUCY2D*- und *RD3*- Patienten könnten also zum Einen darauf zurückzuführen sein, dass sich ein Mangel an cGMP (bei *GUCY2D*-Patienten) weniger schädigend auf die Photorezeptorzelle auswirkt als ein Übermaß von cGMP in den Innensegmenten durch fehlende Hemmung der Guanylatzyklase (bei *RD3*-Patienten). Zum Zweiten wäre auch ein

protektiver Effekt durch die bloße Anwesenheit trotz gestörter Aktivität von RetGC-Molekülen (bei GUCY2D-Mutationen) auf die Retina möglich, wohingegen ihre Abwesenheit in den Außensegmenten (bei RD3-Mutationen) die Degeneration begünstigt.

Es gibt in Verbindung mit *RD3* Mutationen Hinweise auf eine abweichende Expression von Genen, welche eine Rolle in der Phototransduktion, sowie dem Lipidstoffwechsel spielen, so dass man zu dem Schluss kommen kann, dass Defekte in diesen Stoffwechselwegen zusätzlich Grund für die rasche Photorezeptorzelldegeneration verursacht durch *RD3*-Mutationen sein können. [26] Auch hier gibt es Parallelen zu den durchgeführten Experimenten an *rd3*-Mäusen [35].

Nach Abschluss der in dieser Arbeit berichteten Studien wurden in einer weiteren Studie 14 Indexpatienten mit Mutationen im *GUCY2D*-Gen auf relevante Mutationen im *RD3* Gen untersucht, um mögliche Modifikatoren des Phänotyps zu identifizieren [117]. Hierbei zeigten sich lediglich gutartige Polymorphismen, die nicht mit dem Phänotyp korrelierten. Dies führt uns zu dem Schluss, dass *RD3*-Mutationen bei diesem Patientengut keinen Einfluss auf den Phänotyp der untersuchten Patienten mit *GUCY2D*-Mutationen hatten. [117,129] Dies entspricht den Ergebnissen anderer Arbeiten [83,86].

#### **4.9 Mögliche Therapieoptionen bei LCA12 (*RD3*-Mutationen)**

Eine mögliche Therapieoption wäre eine Form der somatischen Gentherapie bei der vektorvermittelt (durch ein gentechnisch verändertes Virus (rAAV)) das mutierten Gen, über eine im Vektor eingeschleuste Normalkopie des betroffenen Gens substituiert wird. Dadurch werden intakte Kopien des Gens nach subretinaler Injektion in den jeweiligen Zielzellen exprimiert und somit ein Protein mit physiologischer Funktion hergestellt. [5,130,131]

Es existieren bereits mehrere Studien an Tiermodellen, die die erfolgreiche Anwendbarkeit der somatischen Gentherapie zur Behandlung von Netzhautdystrophien nachweisen. [13,20,37,67,84,102,107,109,131,139,140]

Im Rahmen klinischer Studien konnte auch an menschlichen LCA-Patienten mit Mutationen im *RPE65*-Gen die somatische Gentherapie erfolgreich angewandt werden. [11,29,38,92,93,127]

Diese Studien zeigten bei den Probanden über den Beobachtungszeitraum von 2 Jahren eine Verbesserung der Netzhautfunktion. Es ließ sich jedoch in den klinischen Studien auch nachweisen, dass die Wirksamkeit der somatischen Gentherapie beim Menschen u. a. vom Alter des behandelten Patienten abhängig zu sein scheint, wobei jüngere Patienten offensichtlich eher von der Therapie profitieren. [32,38,92,127,131]

Bei den bisherigen klinischen Studien stand die Therapie von Patienten mit Mutationen im *RPE65*-Gen im Mittelpunkt, es ist jedoch durchaus denkbar, die Anwendung der somatischen Gentherapie auf andere LCA-Gene wie beispielsweise *RD3* auszuweiten. So existieren seit kurzem erste Ergebnisse zum Versuch der gentherapeutischen Behandlung von rd3-Mäusen [5]. Diese Studien zeigen, dass das Überleben der Photorezeptorzellen vom Vorhandensein der Guanylatzyklase und deren Lokalisation im Außensegment abhängig ist. Die Stäbchen- und Zapfenfunktion konnte mittels somatischer Gentherapie in rd3 30Rk/J Mausstämmen wiederhergestellt werden (Nachweis mittels ERG), wohingegen in ebenfalls therapierten Rb 4Bnr/J Stämmen lediglich die Stäbchenfunktion wiederhergestellt werden konnte. Dies lässt vermuten, dass bei den Rb 4Bnr/J Stämmen ein weiterer beeinflussender Gendefekt in den Zapfen vorliegen muss, der deren Degeneration mitverursacht [6]. Solche beeinflussenden zusätzlichen Gendefekte wären auch bei humanen *RD3* Mutationen denkbar.

Da die Ursache für frühkindliche Netzhautdegeneration bei LCA12 Patienten, der rd3 Maus und den rcd2 Collis wie oben beschrieben im *RD3*-Gen liegt, ist auf dieser Grundlage zukünftig die Entwicklung klinischer Studien von Patienten mit *RD3*-Mutation und der somatischen Gentherapie als potentielle Heilungsmöglichkeit beispielsweise mittels Adeno- assoziierter-viraler Vektorübertragung denkbar.

Wie bereits bei der Behandlung von Patienten mit *RPE65* beschrieben, ist zunächst zu erwarten, dass die Wirksamkeit der somatischen Gentherapie auch bei den Patienten mit *RD3*-Mutationen sehr vom Alter der behandelten Patienten abhängig sein wird.

Problematisch wird sich hierbei die schlechte Untersuchbarkeit von Kleinkindern und Säuglingen auswirken. Die Schwierigkeit zeigt sich bei den *RD3*-Patienten nämlich darin, dass aufgrund des extrem frühen Krankheitsbeginns, bereits ausgeprägte morphologische Veränderungen in den ersten Lebensjahren (siehe Tabelle 9) vorliegen und daher eine entsprechend schnelle Identifizierung der Patienten von Nöten ist, um einen frühen Behandlungsbeginn und damit verbundenen Erfolg zu initiieren. Bereits degenerierte Zellen sind durch die somatische Gentherapie nicht wiederherzustellen. Es ist also davon auszugehen, dass die Wirksamkeit einer somatischen Gentherapie am Größten wäre, wenn diese so früh wie möglich beginnen würde, bevor die Mehrzahl der Photorezeptorzellen degeneriert sind und damit auch mit dieser Methode keine relevanten Verbesserungen mehr herbeizuführen sind. Somit ist das Wissen über den genauen Zeitpunkt des Beginns des Degenerationsprozesses sowie der genaue biochemische Vorgang bezüglich des Einflusses von *RD3* auf den Degenerationsprozess der Photorezeptorzellen von ausschlaggebender Bedeutung und sollte somit Ziel zukünftiger Forschung sein.

Auf Grund der Datenlage ist bei den Patienten dieser Arbeit von einer bereits pränatal beginnenden Entwicklungsstörung mit bereits begonnener Degeneration der Photorezeptorzellschicht und Nervenfaserschicht auszugehen.

Die klinischen Datenlage zu den RD3-Patienten lässt deshalb vermuten, dass eine somatische Gentherapie bereits vor Geburt bzw. umgehend postnatal initiiert werden müsste, da bereits in der ersten Lebensdekade (ab dem 2. Lebensjahr) ausgeprägte Fundusveränderungen bestehen und im Verlauf durch OCT (zu Beginn der 2. Lebensdekade) eine verminderte Dicke der äußeren plexiformen Schicht, der inneren Körnerzellschicht und der inneren plexiformen Schicht als Indiz für eine schwere Schädigung der Photorezeptoren und der Nervenzellschicht nachgewiesen werden können. Diese Veränderungen treten bereits sehr früh auf und zeigen sich im Krankheitsverlauf fortschreiten, weshalb davon ausgegangen werden muss, dass die Entwicklung von Strukturen, welche wichtig für die Ausbildung des visuellen Cortex sind, ebenfalls mit beeinträchtigt sein können.

Ein früher Therapiebeginn würde allerdings eine pränatale genetische Diagnostik bei Risikoeltern inklusive ausführlicher genetischer Beratung voraussetzen. Die genetische Beratung und folgende Diagnostik setzt zum einen die Compliance der Familien voraus sowie die Identifikation von möglichen heterozygoten Allelträgern innerhalb von Risikofamilien. Des Weiteren sollten Ehepartner von heterozygoten Allelträgern, auch wenn in der Familie keine frühkindlichen Netzhautdystrophien bekannt sind, auf eine heterozygote *RD3*-Mutation gescreent werden, um eine adäquate genetische Beratung der Paare zu gewährleisten.

Eine weitere innovative therapeutische Option zur Wiederherstellung des Sehvermögens bei Netzhautdegeneration besteht im Einsatz von Retina-Implantaten. Der Nachteil der derzeit erhältlichen Retina-Implantate besteht darin, dass sie nur die Stäbchenfunktion (Lichtwahrnehmung in Graustufen) ersetzen können, sodass weiterhin ergänzende Sehhilfen benötigt werden. Eine selbstständige Orientierung ist durch diese jedoch angestrebt und ermöglicht eine Autonomie der Patienten im Alltag bis hin zur Erkennung von Buchstaben [18,66,134].

In einer Studie von Chuang und Koautoren wurden verschiedene Typen von Retina-Implantaten bezüglich ihrer klinischen Anwendbarkeit, dem visuellen Wiederherstellungsvermögen (Korrelation mit der Anzahl der Elektroden) und ihrer Langzeit-Biokompatibilität verglichen. Einige der untersuchten Implantate befinden sich derzeit in der klinischen Testphase, andere wiederum wurden bisher nur in Tierversuchen angewendet [28,146].

Beim visuellen Wiederherstellungsvermögen lag das Hauptaugenmerk auf der subjektiven klinischen Verbesserung nach Implantation. Da dazu teilweise Daten

fehlten, wurden zusätzlich technische Daten wie Pixeldichte, Pixelanzahl und das Gesichtsfeld der Implantate verglichen [66,134].

Es gibt 2 unterschiedliche Implantationslokalisationen subretinal (zwischen Pigmentepithel und der verbleibenden Photorezeptorschicht), was eine Interaktion mit den Ganglienzellen der inneren Retinaschichten voraussetzt und eine chirurgische Herausforderung darstellt oder epiretinal (oberhalb der Nervenzellschicht auf der Retina fixiert), woraus retinale Narben resultieren [28,96,146].

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal besteht in der Detektion. Es gibt Implantate, die mit externen Kameras arbeiten, welche die gewonnenen Daten zu implantierten Elektroden weiterleiten (Vorteil leichtere Kontrolle und Wartung, Linsen oder Korneadefekte spielen keine Rolle)[134] oder Photodioden-Arrays, welche den Augenbewegungen folgen und dadurch einen möglichst natürlichen Sehverlauf simulieren [28]. Einige Implantate bieten sogar die Möglichkeit der individuellen Kalibrierung und damit zur schrittweisen Anpassung an den Patienten [96].

Insgesamt zeigte sich jedoch ein Versagen der Implantate nach jahrelangem neuronalem Abbau, sodass bei hereditären Netzhautdystrophien mit frühem Beginn, wie bei den in unserer Arbeit untersuchten Patienten mit *RD3*-Mutation, Retinaimplantate in der Neonatologie den Meilenstein in der weiteren Therapie bedeuten würden [28]. Es ist davon auszugehen, dass eine Implantation von Retinaimplantaten bei den von uns untersuchten Patienten nicht den gewünschten Erfolg bringen würden. Zum einen hängt dies mit der fortgeschrittenen retinalen Degeneration und dem folgenden neuronalen Abbau zusammen und zum anderen ist ein funktioneller Erfolg der Implantate nur bei ausgebildetem visuellen Cortex vorhanden. Auf Grund der klinischen Daten lässt sich davon ausgehen, dass es sich bei *RD3*-Mutationen um eine Zapfen-Stäbchendystrophie, wie auch im Hundemodell, handelt und somit bezüglich der Stäbchenfunktion eine visuelle Cortexausbildung stattgefunden haben muss, was weitere Aussagen angeht, ist die Datenlage jedoch unzureichend.

#### **4.10 Ausblick**

In der vorliegenden Dissertation wurde die ursächliche Mutation für die frühkindliche Netzhautdystrophie, an der mehrere Mitglieder einer konsanguinen kurdischen Familie litten, im *RD3*-Gen identifiziert.

Zusammenfassend kann man derzeit sagen, dass Mutationen im *RD3*-Gen nur eine sehr kleine Gruppe von Patienten mit schwerer frühkindlicher Netzhautdystrophie betreffen, welche mit einem schweren Phänotyp mit frühem Beginn einhergehen.

Weiterführende ophthalmogenetische Forschungen bezüglich des *RD3*-Gens und dessen teilweise noch unbekannter Funktion sind neben der Identifizierung weiterer Patienten die Grundlage für eine zukünftige erfolgreiche Entwicklung und Anwendung therapeutischer Verfahren (z.B. der somatischen Gentherapie, Retina-Implantate) und damit einer zukünftigen potentiellen Therapierbarkeit der *RD3*-Mutation. Des Weiteren sind ausführliche individuelle Verlaufsbeschreibungen des Phänotyps bzw. des Krankheitsverlaufes essentiell, um die Genotyp-Phänotyp-Korrelationen zu verbessern und auf eine breitere Datenbasis zu setzen. Letzteres ist notwendig, um die Patienten besser und schneller einzuordnen und mögliche Therapieoptionen zu entwickeln. In dieser Arbeit war es durch die jahrelangen regelmäßigen Untersuchungen der Betroffenen der Familie 659, in der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Giessen, möglich den Phänotyp und die Entwicklung der retinalen Degeneration bei *RD3*-Mutationen in Abhängigkeit des Alters näher zu beschreiben. Dennoch bestehen auch hier bezüglich der Untersuchungszeitpunkte und damit vergleichbarer Untersuchungstechniken Lücken, wodurch ein genauer zeitlicher Verlauf der Degeneration nicht erstellt werden kann. Zusätzlich erschwert das Fehlen klinischer Daten aus anderen *RD3*-Studien (Perrault und Kollegen etc.) einen validen Vergleich. Die hier durchgeführte Genotyp-Phänotyp-Korelation zeigt jedoch deutlich, dass es sich um einen bereits pränatal einsetzenden Degenerationsprozess handeln muss, weshalb weiterführende regelmäßige Kontrollen und eine zunehmende Standardisierung der Untersuchungstechniken unter Einbeziehung neuester Untersuchungsverfahren bei dieser Familie und ihren Nachkommen essentiell erscheinen um den Degenerationsprozess bei Patienten mit *RD3*-Mutation besser verstehen zu lernen.

### 5.1 Zusammenfassung

Ziel dieser Dissertation war es, die ursächliche Mutation für die schwere frühkindliche Netzhautdegeneration in einer konsanguinen kurdischen Familie mit fünf betroffenen Familienmitgliedern zu identifizieren.

Vorab waren Mutationen in *RetGC1*, *RPE65*, *LRAT*, *AIPL1*, *CRX*, *CRB1*, *CEP290*, *RPGRIP*, *TULP1* und *GUCY2D* ausgeschlossen worden. Über Kopplungsanalysen, mit Hilfe des Affymetrix Mapping 50k Xba 240 Array (Affymetrix, High Wycombe, UK) durch das Max Delbrück Center für Molekulare Medizin (Berlin-Buch) über das Modell eines autosomal rezessiven Erbgangs mit dem Programm ALOHOMORA und MERLIN, erfolgte die Eingrenzung des möglichen Genlocus. Dieser Kopplungsbereich auf Chromosom 1q31-32 wurde mittels Feinkartierung mit Mikrosatelitenmarkern und dem Programm MERLIN weiter eingegrenzt. Der Genlocus konnte hiermit nahe des RD3 Locus kartiert werden. Eine anschließende Suche in UniSTS und dbSNP Datenbanken von NCBI (National Center for Biotechnology Information) ergab 7 mögliche Kandidaten-Gene in diesem Bereich, deren Eigenschaften und vermuteten Funktionen sie als Kandidatengene hervorhoben. Dabei war *RD3* besonders interessant. Die Sanger-Sequenzierung ergab eine Nonsense-Mutation im *RD3*-Gen, welche in allen erkrankten Familienmitgliedern homozygot vorlag. Es handelt sich um eine Nonsense Mutation (p.Y60x (c.180C>A)) im Exon 1 des *RD3*-Gens bei der Cytosin durch Adenin ersetzt wird und daraufhin ein vorzeitiges Stop-Codon entsteht.

Der durch das Stop Codon verursachte frühzeitige Abbruch der mRNA-Synthese führt wahrscheinlich zu einem vorzeitigen Abbau der mRNA und zum vollständigen Funktionsverlust von RD3. Dies hat zur Folge, dass der durch RD3 beeinflusste Transport von RetGC in die Außensegmente der Photorezeptorzellen gestört wird und die durch RD3 verursachte Hemmung von RetGC verloren geht, wodurch es zu einem Anstieg von cGMP in den Photorezeptorinnensegmenten kommt. Weitere biochemische Funktionen von RD3 sind derzeit noch unbekannt, weshalb weiterführende Forschungen zukünftig zu erwarten sind, um therapeutische Verfahren entwickeln zu können.

Die Auswertung der klinischen Untersuchungsergebnisse der fünf Betroffenen der Familie konnten über einen Alterszeitraum zwischen 3 Monaten und 22 Jahren ausgewertet werden. Die klinische Symptomatik, die mit der hier gefundenen Mutation im *RD3*-Gen einhergeht, äußert sich in ausgeprägter Nachtblindheit, einem deutlich eingeschränkten Gesichtsfeld, einer schweren Visusminderung, einem ausgeprägten Nystagmus, einer erhöhten Blendempfindlichkeit und einem ERG, dass kongenital unter der Nachweisgrenze lag. Fundusveränderungen waren bereits in den ersten Lebensjahren zu erkennen und die durchgeführten OCT-Untersuchungen ergaben eine



mit fortschreitendem Lebensalter zunehmende Reduktion der Retinadicke und früh erkennbare und zunehmende Desorganisation der Netzhautschichten als Zeichen der retinalen Degeneration. Die Etablierung von Tiermodellen zur Entwicklung und Erprobung kurativer therapeutischer Verfahren, wie z.B. der somatischen Gentherapie bei LCA12, bedürfen zunächst noch zukünftiger Forschung bezüglich der Funktion von RD3. Eine gute Grundlage hierfür bieten die vergleichbaren Erkrankungen mit Mutationen im *RD3*-Gen bei Mäusen (*rd3* Mäuse) sowie Hunden (*rcd2* Collis). Es existieren bereits erste Ergebnisse zum Versuch der somatischen Gentherapie bei *rd3* Mäusen.

Die Chance auf eine kurative Therapie durch Anwendung der somatischen Gentherapie setzt eine frühe Diagnosestellung bei Patienten mit *RD3*-Mutation voraus, noch vor Beginn der Photorezeptorzelldegeneration, da es sich um eine Erkrankung mit schwerem Phänotyp mit frühem Beginn handelt. Zudem sollten weitere Genotyp-Phänotyp –Korrelationen zur Verbesserung der klinischen Datenlage bezüglich des Degenerationsprozesses erfolgen. Auch hier ist zukünftig eine weiterführende Forschung Voraussetzung.

## 5.2. Summary

The purpose of this thesis was to identify the causal mutation of an early onset retinal degeneration in a Kurdish family with five affected people.

Mutations in *RetGC1*, *RPE65*, *LRAT*, *AIPL1*, *CRX*, *CRB1*, *CEP290*, *RPGRIP*, *TULP1* and *GUCY2D* have been excluded. Genlocus identification was performed by means of linkage analysis under a model of autosomal recessive inheritance with Affymetrix Mapping 50k Xba 240 Array (Affymetrix, High Wycombe, UK) by Max Delbrück Center für Molekulare Medizin (Berlin-Buch) by application of the ALOHOMORA and MERLIN software.

The linkage area on chromosome 1q31-32 was mapped next to the *RD3* locus by using microsatellite marker and the linkage program MERLIN.

Seven possible candidate genes with interesting function and characteristics were detected by prospecting UniSTS and dbSNP databases of NCBI (National Center for Biotechnology Information). *RD3* was highlighted. A homozygote nonsense mutation in the affected family members was identified by Sanger-sequencing. The nonsense mutation in *RD3* exon 1 creates a new stop-codon that is generated through a change from Cytosin to Adenin. This new stop-codon is probably the reason for premature degradation of the mRNA which leads to a loss of functionality of *RD3*. The result is an increase of cGMP because of a disturbed transport of RetGC into the outer segment of the photoreceptor cell and the loss of the inhibitory function from RD3 on RetGC. Other biochemical function of RD3 are not identified yet. This is the reason why experimental research in the future will be necessary for the development of a therapeutic treatment. The results of the clinical examination of the five affected persons of the family with ages ranging from 3 months to 22 years were night blindness, limited visual field, nystagmus, glare sensitivity and an ERG below threshold.

Transformation of the ocular fundus could be detected during the first years of live.

OCT- examination detected increasing reduction of retinal thickness with disorganisation of all retinal layers indicating retinal degeneration.

In order to establish an LCA12 animal model for developing and testing therapeutic treatment such as somatic gene therapies, additional research on RD3 function is needed in the future. The comparable disease of mutation in *rd3*-mice and *rcd2*-collies offers a good basis.

There are first results available of experiments with regard to somatic genetherapie with *rd3*-mice. In order to be able to use somatic gene therapy, it is necessary to make an early diagnosis of people with mutations in *RD3*, before the start of the photoreceptor cell degeneration to account for the severe phenotype with very early beginning. Additional genotype-phenotype-correlations are necessary regarding the

## 5. Zusammenfassung

process of the retinal degeneration upon the recoded clinical data. Continuing experimental research is absolutely essential in the future.

### **6. Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Aufbau des Auges

Abbildung 2: Phototransduktion

Abbildung 3: Stammbaum der Kernfamilie

Abbildung 4: Stammbaum der Familie 659

Abbildung 5: Position der in dieser Arbeit eingesetzten Mikrosatelliten auf Chromosom 1q  
21200-21800Mb

Abbildung 6: Fundusphotographien der Patienten der Familie 659

Abbildung 7: Fundusautofluoreszenzaufnahmen

Abbildung 8: Optische Kohärenztomographie (OCT) der Patienten

Abbildung 9: LOD-Score Plot der SNP-Typisierung

Abbildung 10: Auswertung der Allelverteilung der Mikrosatellitenanalyse

Abbildung 11: LOD-Score Plot der Kandidatengene (aus [117])

## **7. Tabellenverzeichnis**

### **7. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: In der Literatur beschriebene ursächliche Gene für Lebersche kongenitale Amaurose (LCA) und frühkindlicher schwerer Netzhautdegeneration

Tabelle 2: Materialnachweis

Tabelle 3: Verbrauchsmaterial

Tabelle 4: Gerätenachweis

Tabelle 5: Primer für Mikrosatelliten-PCR

Tabelle 6: Eigenschaften in der Arbeit eingesetzter Mikrosatellitenmarker

Tabelle 7: Versuchsbedingungen bei 2%igem Agarose-Gel

Tabelle 8: M-Methode bei Benutzung des QIAxcel DNA High Resolution Kit

Tabelle 9: Phänotypische Ausprägung der RD3 Mutation bei den Betroffenen der Familie 659

## 8. Abkürzungsverzeichnis

### 8. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AAV	adeno-assoziiertes Virus
<i>AiPL1</i>	Aryl hydrocarbon receptor interacting protein-like 1
bp	Basenpaare
C	Cystein (als Aminosäure), Cytosin (als Base), Choroidea
c	Sequenposition innerhalb der kodierenden DNA
CC	connecting cilia
<i>CEP290</i>	Centrosomal protein 290 kDa
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cM	centi-Morgan
CNCG1 / CNCG2	cGMP-gesteuerter Kationen-Kanal Untereinheit 1/2
<i>CRB1</i>	Crumbs homolog 1
<i>CRX</i>	Cone-rod homeobox
<i>C1orf 36</i>	Chromosome 1 open reading frame 36
-d	Datendatei
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELM	outer limiting membrane
EOSRD	early onset severe retinal dystrophy
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERG	Elektroretinogramm
etc.	Etcetera
EtOH	Ethyl-Alkohol
F	Allelfrequenz
f	Founder, weisen innerhalb des Stammbaumes keine Eltern auf
G	Guanin
GDP	Guanosindiphosphat
GCL	ganglion cell layer (Ganglienzellschicht)
GCAP1 und GCAP2	Guanylatzyklase aktivierende Proteine 1/2
GNAT / GNB / GNG	G-Protein Transducin ( $\alpha$ -/ $\beta$ -/ $\gamma$ -Untereinheit)
GTP	Guanosintriphosphat
<i>GUCY2D</i>	Guanylate cyklase 2D

## 8. Abkürzungsverzeichnis

$H_0$	Nullhypothese
$H_1$	Arbeitshypothese
HGMD	Human Gene Mutation Database
IFT	intraflagellarer Transport
INL	inner nuclear layer (innere Körnerzellschicht)
IPL	inner plexiform layer (Innere plexiforme Schicht)
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kV	Kilovolt
L	Quotienten der Kopplungswahrscheinlichkeit (Likelihood)
LCA	Lebersche kongenitale Amaurose
LEA-Lesetafeln	Lesetafeln nach Lea-Hyvärinen
<i>LRAT</i>	Lecithin retinol acyltransferase
LOD-Score	(Logarithm of the odds
LOD score (Z)	statistische Abschätzung einer gemeinsamen Vererbung, dekadische Logarithmus der Odds Ratio
logMAR	dekadischer Logarithmus des minimalen Auflösungswinkels (= minimum angle resolution)
M	Morgan (Entfernung zwischen zwei Genloci) oder Markername
Mb	Megabasenpaar
MERLIN	Multipoint Engine of Rapid Likelihood Inference
min	Minute
MgCl	Magnesiumchlorid
ml	Mililiter
n	Anzahl, nonfounder Eltern sind innerhalb des Stammbaumes zu finden
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
$NH_4Cl$	Ammoniumchlorid
NCKX	$Na^+/Ca^{2+}/K^+$ -Austauscher
NMD	nonsense-mediated decay
nm	Nanometer
NPL	non-parametric linkage score
OCT	Optische Kohärenztomographie
ONL	outer nuclear layer (äußere Körnerzellschicht)
OPL	outer plexiform layer (äußere plexiforme Schicht)

## 8. Abkürzungsverzeichnis

-p	Stammbaumdatei
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PDEA / PDEB / PDEG	Phosphodiesterase 6 ( $\alpha$ -/ $\beta$ -/ $\gamma$ -Untereinheit)
PDF	Portable Document Format
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PIS	photoreceptor inner segments (Innensegment der Photorezeptorzelle)
POS	photoreceptor outer segments (Außensegment der Photorezeptorzelle)
QTD	Quantitative Transmission Disequilibrium Test
R	Retina
rcd2	Stäbchen-Zapfen-Dysplasie Typ 2 (Rod-cone dysplasia type 2)
RD3	Retinal degeneration 3
RetGC1/RetGC2	Retinale Guanylatzyklase 1/2
RGS9	Guanylatzyklase aktivierendes Protein
RHO	Rhodopsin (mit 11-cis-Retinall)
RHO*	aktiviertes Rhodopsin (mit all-trans-Retinal)
RNA	Ribonukleinsäure
RPE	retinales Pigmentepithel
RPE65	Retinal pigment epithelium-specific protein 65 kDa
RPGRIP	Retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein
S	Sklera
s	Sekunde
SE-Puffer	Saline-EDTA-Puffer
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
SSCP	Single-Strand Conformation Polymorphism
STR	short tandem repeats
T	Thymin
TAC	Teller Acuity Cards
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TULP1	Tubby like protein 1-Gen
V	Volt
VEP	visuell evozierter Potentiale
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Θ	Rekombinationsfrequenz Theta



### 9. Literaturverzeichnis

- 1 Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO, Cardon LR. Merlin--rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat Genet* 2002; 30(1):97-101
- 2 Aboussair N, Berahou A, Perrault I, Elalaoui SC, Megzari A, Rozet JM et al. [First North African observation of Leber congenital amaurosis secondary to CEP290 gene mutation] Premiere observation maghebaine d'amaurose congenitale de Leber secondaire a une mutation du gene CEP290. *J Fr Ophtalmol* 2010; 33(2):117-5
- 3 Acland GM, Aguirre GD. Retinal degenerations in the dog: IV. Early retinal degeneration (erd) in Norwegian elkhounds. *Exp Eye Res* 1987; 44(4):491-521
- 4 Acland GM, Aguirre GD, Bennett J, Aleman TS, Cideciyan AV, Bennicelli J et al. Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. *Mol Ther* 2005; 12(6):1072-1082
- 5 Acland GM, Aguirre GD, Ray J, Zhang Q, Aleman TS, Cideciyan AV et al. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet* 2001; 28(1):92-95
- 6 Acland GM, Fletcher RT, Gentleman S, Chader GJ, Aguirre GD. Non-allelism of three genes (rcl1, rcl2 and erd) for early-onset hereditary retinal degeneration. *Exp Eye Res* 1989; 49(6):983-998
- 7 Ahmad A, Daud S, Kakar N, Nurnberg G, Nurnberg P, Babar ME et al. Identification of a novel LCA5 mutation in a Pakistani family with Leber congenital amaurosis and cataracts. *Mol Vis* 2011; 17:1940-1945
- 8 Aldahmesh MA, Al-Owain M, Alqahtani F, Hazzaa S, Alkuraya FS. A null mutation in CABP4 causes Leber's congenital amaurosis-like phenotype. *Mol Vis* 2010; 16:207-212
- 9 Augustin AJ. *Augenheilkunde*, 2007. Springer, Berlin, ISBN: 3540304541.
- 10 Azadi S, Molday LL, Molday RS. RD3, the protein associated with Leber congenital amaurosis type 12, is required for guanylate cyclase trafficking in photoreceptor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(49):21158-21163
- 11 Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K et al. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2008; 358(21):2231-2239
- 12 Bangsow T, Deutsch U, Engel H, Korfhage C, Löffert D.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In: Jansohn M, Aigner A, (Hrsg.). *Gentechnische Methoden - Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. 4. Auflage, 2007: 153-187. Elsevier, Spektrum, Akad. Verl., München, ISBN: 9783827415370.
- 13 Batten ML, Imanishi Y, Tu DC, Doan T, Zhu L, Pang J et al. Pharmacological and rAAV gene therapy rescue of visual functions in a blind mouse model of Leber congenital amaurosis. *PLoS Med* 2005; 2(11):e333

## 9. Literaturverzeichnis

- 14 Baylor DA, Lamb TD, Yau KW. Responses of retinal rods to single photons. *J Physiol* 1979; 288:613-34.:613-634
- 15 Baylor DA, Lamb TD, Yau KW. The membrane current of single rod outer segments. *J Physiol* 1979; 288:589-611.:589-611
- 16 Baylor DA, Nunn BJ, Schnapf JL. The photocurrent, noise and spectral sensitivity of rods of the monkey *Macaca fascicularis*. *J Physiol* 1984; 357:575-607.:575-607
- 17 Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 1995; 75(4):725-748
- 18 Benav H, Bartz-Schmidt KU, Besch D, Bruckmann A, Gekeler F, Greppmaier U et al. Restoration of useful vision up to letter recognition capabilities using subretinal microphotodiodes. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2010; 2010:5919-22.:5919-5922
- 19 Beninghoff A, Drenckhahn D., Kapitel 2, (2.4, 2.5, 2.15, 2.17) In: Beninghoff A, Drenckpohl D, (Hrsg.). *Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. 16. Auflage, 2002: Seite (31-45, 80-85, 87-88) Urban & Fischer Verlag, ISBN: 978-3437423406.
- 20 Bennicelli J, Wright JF, Komaromy A, Jacobs JB, Hauck B, Zeleniaia O et al. Reversal of blindness in animal models of leber congenital amaurosis using optimized AAV2-mediated gene transfer. *Mol Ther* 2008; 16(3):458-465
- 21 Bock M, Gerth C, Lorenz B. Impact of notch filter use on waveforms of First- and Second-Order-Kernel responses from multifocal ERGs. *Doc Ophthalmol* 2000; 101(3):195-210
- 22 Bowne SJ, Sullivan LS, Mortimer SE, Hedstrom L, Zhu J, Spellicy CJ et al. Spectrum and frequency of mutations in IMPDH1 associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa and leber congenital amaurosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(1):34-42
- 23 Caberoy NB, Maignel D, Kim Y, Li W. Identification of tubby and tubby-like protein 1 as eat-me signals by phage display. *Exp Cell Res* 2010; 316(2):245-257
- 24 Caberoy NB, Zhou Y, Li W. Tubby and tubby-like protein 1 are new MerTK ligands for phagocytosis. *EMBO J* 2010; 29(23):3898-3910
- 25 Chang B, Heckenlively JR, Hawes NL, Roderick TH. New mouse primary retinal degeneration (rd-3). *Genomics* 1993; 16(1):45-49
- 26 Cheng CL, Molday RS. Changes in gene expression associated with retinal degeneration in the rd3 mouse. *Mol Vis* 2013; 19:955-969
- 27 Cheng J, Maquat LE. Nonsense codons can reduce the abundance of nuclear mRNA without affecting the abundance of pre-mRNA or the half-life of cytoplasmic mRNA. *Mol Cell Biol* 1993; 13(3):1892-1902

## 9. Literaturverzeichnis

- 28 Chuang AT, Margo CE, Greenberg PB. Retinal implants: a systematic review. *Br J Ophthalmol* 2014; 10-303708
- 29 Cideciyan AV. Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations and its treatment with gene therapy. *Prog Retin Eye Res* 2010; 29(5):398-427
- 30 Cideciyan AV, Aleman TS, Boye SL, Schwartz SB, Kaushal S, Roman AJ et al. Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(39):15112-15117
- 31 Cideciyan AV, Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, Schwartz SB, Boye SL et al. Human RPE65 gene therapy for Leber congenital amaurosis: persistence of early visual improvements and safety at 1 year. *Hum Gene Ther* 2009; 20(9):999-1004
- 32 Cideciyan AV, Jacobson SG, Beltran WA, Sumaroka A, Swider M, Iwabe S et al. Human retinal gene therapy for Leber congenital amaurosis shows advancing retinal degeneration despite enduring visual improvement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(6):E517-E525
- 33 Clerget-Darpoux F, Bonaiti-Pellie C, Hochez J. Effects of misspecifying genetic parameters in lod score analysis. *Biometrics* 1986; 42(2):393-399
- 34 Danciger JS, Danciger M, Nusinowitz S, Rickabaugh T, Farber DB. Genetic and physical maps of the mouse rd3 locus; exclusion of the ortholog of USH2A. *Mamm Genome* 1999; 10(7):657-661
- 35 Danciger M, Ogando D, Yang H, Matthes MT, Yu N, Ahern K et al. Genetic modifiers of retinal degeneration in the rd3 mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49(7):2863-2869
- 36 Dechert U.2. Gelelektrophoresen. In: Jansohn M, Aigner A, (Hrsg.). *Gentechnische Methoden - Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. 4. Auflage, 2007: 39-90. Elsevier, Spektrum, Akad. Verl., München, ISBN: 9783827415370.
- 37 Dejneka NS, Surace EM, Aleman TS, Cideciyan AV, Lyubarsky A, Savchenko A et al. In utero gene therapy rescues vision in a murine model of congenital blindness. *Mol Ther* 2004; 9(2):182-188
- 38 den Hollander AI, Black A, Bennett J, Cremers FP. Lighting a candle in the dark: advances in genetics and gene therapy of recessive retinal dystrophies. *J Clin Invest* 2010; 120(9):3042-3053
- 39 den Hollander AI, Heckenlively JR, van den Born LI, de Kok YJ, Velde-Visser SD, Kellner U et al. Leber Congenital Amaurosis and Retinitis Pigmentosa with Coats-like exudative vasculopathy are associated with mutations in the crumbs homologue 1 (CRB1) gene. *Am J Hum Genet* 2001; 69(1):198-203

## 9. Literaturverzeichnis

- 40 den Hollander AI, Koenekoop RK, Yzer S, Lopez I, Arends ML, Voesenek KE et al. Mutations in the CEP290 (NPHP6) Gene Are a Frequent Cause of Leber Congenital Amaurosis. *Am J Hum Genet* 2006; 79(3):556-561
- 41 Deterre P, Bigay J, Forquet F, Robert M, Chabre M. cGMP phosphodiesterase of retinal rods is regulated by two inhibitory subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(8):2424-2428
- 42 Drexler W, Fujimoto JG. State-of-the-art retinal optical coherence tomography. *Prog Retin Eye Res* 2008; 27(1):45-88
- 43 Dryja TP, Adams SM, Grimsby JL, McGee TL, Hong DH, Li T et al. Null RPGRIP1 alleles in patients with leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet* 2001; 68(5):1295-1298
- 44 Elston RC, Stewart J. A general model for the genetic analysis of pedigree data. *Hum Hered* 1971; 21(6):523-542
- 45 Farber DB. From mice to men: The cyclic GMP phosphodiesterase gene in vision and disease - The Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36:263-275
- 46 Fishelson M, Geiger D. Exact genetic linkage computations for general pedigrees. *Bioinformatics* 2002; 18 Suppl 1:S189-98.:S189-S198
- 47 Florio SK, Prusti RK, Beavo JA. Solubilization of membrane-bound rod phosphodiesterase by the rod phosphodiesterase recombinant delta subunit. *J Biol Chem* 1996; 271(39):24036-24047
- 48 Foster A., Gilbert C. Epidemiology of childhood blindness. *Eye* 1992; 6(Pt 2):173-176
- 49 Friedman JS, Chang B, Kannabiran C, Chakarova C, Singh HP, Jalali S et al. Premature truncation of a novel protein, RD3, exhibiting subnuclear localization is associated with retinal degeneration. *Am J Hum Genet* 2006; 79(6):1059-1070
- 50 Fung BK, Hurley JB, Stryer L. Flow of information in the light-triggered cyclic nucleotide cascade of vision. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78:152-156
- 51 Gerth C, Andrassi-Darida M, Bock M, Preising MN, Weber BH, Lorenz B. Phenotypes of 16 Stargardt macular dystrophy/fundus flavimaculatus patients with known ABCA4 mutations and evaluation of genotype-phenotype correlation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2002; 240(8):628-638
- 52 Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT. Kapitel 1-6, In: Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, (Hrsg.). *An Introduction to Genetic Analysis*. 5. Auflage, 1993: W.H.Freeman & Co Ltd, New York, ISBN: 978-0716722854.
- 53 Grossman GH, Beight CD, Ebke LA, Pauer GJ, Hagstrom SA. Interaction of tubby-like protein-1 (Tulp1) and microtubule-associated protein (MAP) 1A and MAP1B in the mouse retina. *Adv Exp Med Biol* 2014; 801:511-8. doi: 10.1007/978-1-4614-3209-8\_65.:511-518

## 9. Literaturverzeichnis

- 54 Grossman GH, Watson RF, Pauer GJ, Bollinger K, Hagstrom SA. Immunocytochemical evidence of Tulp1-dependent outer segment protein transport pathways in photoreceptor cells. *Exp Eye Res* 2011; 93(5):658-668
- 55 Gu S, Thompson DA, Srisailapathy Srikumari CR, Lorenz B, Finckh U, Nicoletti A. et al. Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet* 1997; 17(2):194-197
- 56 Hagstrom SA, Watson RF, Pauer GJ, Grossman GH. Tulp1 is involved in specific photoreceptor protein transport pathways. *Adv Exp Med Biol* 2012; 723:783-9:783-789
- 57 Hanein S, Perrault I, Gerber S, Delphin N, BenEzra D, Shalev S et al. Population history and infrequent mutations: how old is a rare mutation? *GUCY2D* as a worked example. *Eur J Hum Genet* 2008; 16(1):115-123
- 58 Hanein S, Perrault I, Gerber S, Tanguy G, Barbet F, Ducroq D et al. Leber congenital amaurosis: comprehensive survey of the genetic heterogeneity, refinement of the clinical definition, and genotype-phenotype correlations as a strategy for molecular diagnosis. *Hum Mutat* 2004; 23(4):306-317
- 59 Hanein S, Perrault I, Olsen P, Lopponen T, Hietala M, Gerber S et al. Evidence of a founder effect for the *RETGC1* (*GUCY2D*) 2943delG mutation in Leber congenital amaurosis pedigrees of Finnish origin. *Hum Mutat* 2002; 20(4):322-323
- 60 Hargrave PA, McDowell JH. Rhodopsin and Phototransduction. *Int Rev Cytol* 1992; 49-97
- 61 Hargrave PA, McDowell JH. Rhodopsin and phototransduction: a model system for G protein- linked receptors. *FASEB Journal* 1992; 6:2323-2331
- 62 Hawes NL, Smith RS, Chang B, Davisson M, Heckenlively JR, John SW. Mouse fundus photography and angiography: a catalogue of normal and mutant phenotypes. *Mol Vis* 1999; 5:22
- 63 Heckenlively JR, Chang B, Peng C, Hawes NL, Roderick TH. Variable expressivity of rd-3 retinal degeneration dependent on background strain. In: Hollyfield JG, Anderson RE, LaVail MM, (Hrsg.). *Retinal degeneration: clinical and laboratory applications*. 1993: 273-280. Plenum Press, New York
- 64 Henderson RH, Williamson KA, Kennedy JS, Webster AR, Holder GE, Robson AG et al. A rare de novo nonsense mutation in *OTX2* causes early onset retinal dystrophy and pituitary dysfunction. *Mol Vis* 2009; 15:2442-7:2442-2447
- 65 Hong DH, Yue G, Adamian M, Li T. Retinitis pigmentosa GTPase regulator (*RPGR*)-interacting protein is stably associated with the photoreceptor ciliary axoneme and anchors *RPGR* to the connecting cilium. *J Biol Chem* 2001; 276(15):12091-12099

## 9. Literaturverzeichnis

- 66 Humayun MS, Dorn JD, Da CL, Dagnelie G, Sahel JA, Stanga PE et al. Interim results from the international trial of Second Sight's visual prosthesis. *Ophthalmology* 2012; 119(4):779-788
- 67 Jacobson SG, Acland GM, Aguirre GD, Aleman TS, Schwartz SB, Cideciyan AV et al. Safety of recombinant adeno-associated virus type 2-RPE65 vector delivered by ocular subretinal injection. *Mol Ther* 2006; 13(6):1074-1084
- 68 Jacobson SG, Cideciyan AV. Treatment possibilities for retinitis pigmentosa. *N Engl J Med* 2010; 363(17):1669-1671
- 69 Jacobson SG, Cideciyan AV, Ratnakaram R, Heon E, Schwartz SB, Roman AJ et al. Gene therapy for leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years. *Arch Ophthalmol* 2012; 130(1):9-24
- 70 Kellner U, Renner AB, Tillack H. [Hereditary retinal dystrophies. 2: Differential diagnosis] Hereditäre Netzhaut-Aderhaut-Dystrophien - Teil 2: Differenzialdiagnose. *Ophthalmologe* 2004; 101(4):397-412
- 71 Kiser PD, Golczak M, Maeda A, Palczewski K. Key enzymes of the retinoid (visual) cycle in vertebrate retina. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1821(1):137-151
- 72 Koenekoop RK, Wang H, Majewski J, Wang X, Lopez I, Ren H et al. Mutations in NMNAT1 cause Leber congenital amaurosis and identify a new disease pathway for retinal degeneration. *Nat Genet* 2012; 44(9):1035-1039
- 73 Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES. Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet* 1996; 58(6):1347-1363
- 74 Kühn H. Light- and GTP-regulated interaction of GTPase and other proteins with bovine photoreceptor membranes. *Nature* 1980; 283(5747):587-589
- 75 Kühn H, Bennett N, Michel-Villaz M, Chabre M. Interactions between photoexcited rhodopsin and GTP-binding protein: kinetic and stoichiometric analyses from light-scattering changes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78(11):6873-6877
- 76 Kukekova AV, Goldstein O, Johnson JL, Richardson MA, Pearce-Kelling SE, Swaroop A et al. Canine RD3 mutation establishes rod-cone dysplasia type 2 (rcd2) as ortholog of human and murine rd3. *Mamm Genome* 2009; 20(2):109-123
- 77 Kukekova AV, Nelson J, Kuchtey RW, Lowe JK, Johnson JL, Ostrander EA et al. Linkage mapping of canine rod cone dysplasia type 2 (rcd2) to CFA7, the canine orthologue of human 1q32. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(3):1210-1215
- 78 Kwok MC, Holopainen JM, Molday LL, Foster LJ, Molday RS. Proteomics of photoreceptor outer segments identifies a subset of SNARE and Rab proteins

## 9. Literaturverzeichnis

- implicated in membrane vesicle trafficking and fusion. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7(6):1053-1066
- 79 Kwok PY, Williford CT. Kapitel 1,4,10, 11, 15, Single Nucleotide Polymorphisms: Methods and Protocols. 2002: Seite 1-15, 47-59, 129-167, 197-215, Humana Press, Berlin, ISBN: 978-0896039681.
- 80 Lander ES, Green P. Construction of multilocus genetic linkage maps in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(8):2363-2367
- 81 Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J. Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81(11):3443-3446
- 82 Lathrop GM, Lalouel JM, White RL. Construction of human linkage maps: likelihood calculations for multilocus linkage analysis. *Genet Epidemiol* 1986; 3(1):39-52
- 83 Lavorgna G, Lestingi M, Ziviello C, Testa F, Simonelli F, Manitto MP et al. Identification and characterization of C1orf36, a transcript highly expressed in photoreceptor cells, and mutation analysis in retinitis pigmentosa. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308(3):414-421
- 84 Le Meur G, Stieger K, Smith AJ, Weber M, Deschamps JY, Nivard D et al. Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. *Gene Ther* 2007; 14(4):292-303
- 85 Leber T. Über Retinitis pigmentosa und angeborene Amaurose. *Albrecht von Graefes Arch Ophthal* 1869; 15:1-25
- 86 Li Y, Wang H, Peng J, Gibbs RA, Lewis RA, Lupski JR et al. Mutation survey of known LCA genes and loci in the Saudi Arabian population. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(3):1336-1343
- 87 Linberg KA, Fariss RN, Heckenlively JR, Farber DB, Fisher SK. Morphological characterization of the retinal degeneration in three strains of mice carrying the rd-3 mutation. *Vis Neurosci* 2005; 22(6):721-734
- 88 Lorenz B, Gyürüs P, Preising M, Bremser D, Gu S, Andrassi M et al. Early-onset severe rod-cone dystrophy in young children with RPE65 mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(9):2735-2742
- 89 Lorenz B, Preising M, Stieger K. Retinal blinding disorders and gene therapy--molecular and clinical aspects. *Curr Gene Ther* 2010; 10(5):350-370
- 90 Lorenz B, Preising MN. Frühkindliche schwere Netzhautdystrophien - Aktuelle Aspekte zur Leberschen kongenitalen Amaurose. *Z Prakt Augenheilkd* 2003; 24:367-372
- 91 Lorenz B, Wabbels B, Wegscheider E, Hamel CP, Drexler W, Preising MN. Lack of fundus autofluorescence to 488 nanometers from childhood on in patients with early-onset severe retinal dystrophy associated with mutations in RPE65. *Ophthalmology* 2004; 111(8):1585-1594

## 9. Literaturverzeichnis

- 92 Maguire AM, High KA, Auricchio A, Wright JF, Pierce EA, Testa F et al. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 2009; 374(9701):1597-1605
- 93 Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN, Jr., Mingozzi F, Bennicelli J et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2008; 358(21):2240-2248
- 94 Marmor MF, Zrenner E. International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. Standard for clinical electroretinography (1999 update). *Doc Ophthalmol* 1998; 97(2):143-156
- 95 Mataftsi A, Schorderet DF, Chachoua L, Boussalah M, Nouri MT, Barthelmes D et al. Novel TULP1 mutation causing leber congenital amaurosis or early onset retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48(11):5160-5167
- 96 Matthaei M, Zeitz O, Keseru M, Wagenfeld L, Hornig R, Post N et al. Progress in the development of vision prostheses. *Ophthalmologica* 2011; 225(4):187-192
- 97 Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215
- 98 Morton NE. Sequential tests for the detection of linkage. *Am J Hum Genet* 1955; 7(3):277-318
- 99 Müller HJ, Röder T. Kapitel 3.2-3.4, 5,6 In: Müller HJ, Röder T, (Hrsg.). *Der Experimentator. Microarrays*. 2004: Seite 54-99, 143-165, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, ISBN: 978-3827414380.
- 100 Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51 Pt 1:263-73.:263-273
- 101 Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155:335-50:335-350
- 102 Narfstrom K, Katz ML, Bragadottir R, Seeliger M, Boulanger A, Redmond TM et al. Functional and structural recovery of the retina after gene therapy in the RPE65 null mutation dog. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44(4):1663-1672
- 103 Nichols LL, Alur RP, Boobalan E, Sergeev YV, Caruso RC, Stone EM et al. Two novel CRX mutant proteins causing autosomal dominant Leber congenital amaurosis interact differently with NRL. *Hum Mutat* 2010; 31(6):E1472-E1483
- 104 Odom JV, Bach M, Barber C, Brigell M, Marmor MF, Tormene AP et al. Visual evoked potentials standard (2004). *Doc Ophthalmol* 2004; 108(2):115-123
- 105 Ott J. Estimation of the recombination fraction in human pedigrees: efficient computation of the likelihood for human linkage studies. *Am J Hum Genet* 1974; 26(5):588-597



## 9. Literaturverzeichnis

- 106 Ott J., Kapitel 1-4, 7,13, In: Ott J, (Hrsg.). Analysis of Human Genetic Linkage. 3. Auflage, 1999: Seite 1-82, 151-169, 272-295, Johns Hopkins Univ Press, Baltimore, ISBN: 978-0801861406.
- 107 Pang JJ, Chang B, Kumar A, Nusinowitz S, Noorwez SM, Li J et al. Gene therapy restores vision-dependent behavior as well as retinal structure and function in a mouse model of RPE65 Leber congenital amaurosis. *Mol Ther* 2006; 13(3):565-572
- 108 Paunescu K, Preising MN, Janke B, Wissinger B, Lorenz B. Genotype-Phenotype Correlation in a German Family with a Novel Complex CRX Mutation Extending the Open Reading Frame. *Ophthalmology* 2007; 117(7):1348-1357
- 109 Pawlyk BS, Smith AJ, Buch PK, Adamian M, Hong DH, Sandberg MA et al. Gene replacement therapy rescues photoreceptor degeneration in a murine model of Leber congenital amaurosis lacking RPGRIP. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(9):3039-3045
- 110 PENROSE LS. The general purpose sibpair linkage test. *Ann Eugen* 1953; 18(2):120-124
- 111 Perrault I, Delphin N, Hanein S, Gerber S, Dufier JL, Roche O et al. Spectrum of NPHP6/CEP290 mutations in Leber congenital amaurosis and delineation of the associated phenotype. *Hum Mutat* 2007; 28(4):416
- 112 Perrault I, Estrada-Cuzcano A, Lopez I, Kohl S, Li S, Testa F et al. Union makes strength: a worldwide collaborative genetic and clinical study to provide a comprehensive survey of RD3 mutations and delineate the associated phenotype. *PLoS One* 2013; 8(1):e51622
- 113 Perrault I, Hanein S, Gerber S, Barbet F, Ducroq D, Dollfus H et al. Retinal dehydrogenase 12 (RDH12) mutations in leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet* 2004; 75(4):639-646
- 114 Perrault I, Rozet JM, Calvas P, Gerber S, Camuzat A, Dollfus H et al. Retinal-specific guanylate cyclase gene mutations in Leber's congenital amaurosis. *Nat Genet* 1996; 14(4):461-464
- 115 Perrault I, Rozet JM, Ghazi I, Leowski C, Bonnemaïson M, Gerber S et al. Different functional outcome of RetGC1 and RPE65 gene mutations in Leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet* 1999; 64(4):1225-1228
- 116 Peshenko IV, Olshevskaya EV, Azadi S, Molday LL, Molday RS, Dizhoor AM. Retinal Degeneration 3 (RD3) Protein Inhibits Catalytic Activity of Retinal Membrane Guanylyl Cyclase (RetGC) and It's Stimulation by Activating Proteins. *Biochemistry* 2011; 50(44):9511-9519

## 9. Literaturverzeichnis

- 117 Preising MN, Hausotter-Will N, Solbach MC, Friedburg C, Rüschemdorf F, Lorenz B. Mutations in RD3 are associated with an extremely rare and severe form of early onset retinal dystrophy EOSRD. Invest Ophthalmol Vis Sci 2012; 53(7):3463-3472
- 118 Preising MN, Paunescu K, Friedburg C, Lorenz B. Genetische und klinische Heterogenität bei LCA-Patienten : Das Ende der Einheitlichkeit. Ophthalmologe 2007; 104(6):490-498
- 119 Rahi JS, Sripathi S, Gilbert CE, Foster A. Childhood blindness in India: causes in 1318 blind school students in nine states. Eye 1995; 9(Pt 5):545-550
- 120 Rüschemdorf F, Nürnberg P. ALOHOMORA: a tool for linkage analysis using 10K SNP array data. Bioinformatics 2005; 21(9):2123-2125
- 121 Sachsenweger M, Klaus V, Nasemann J, Ugi J. Augenheilkunde. 2. Auflage, 2003. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, ISBN: 3-13-128312-2.
- 122 Santos-Anderson RM, Tso MO, Wolf ED. An inherited retinopathy in collies. A light and electron microscopic study. Invest Ophthalmol Vis Sci 1980; 19(11):1281-1294
- 123 Schlote T, Grüb M, Mielke J. Taschenatlas Augenheilkunde., 2004. Thieme, Stuttgart, ISBN: 978-3131314819.
- 124 Sergouniotis PI, Davidson AE, Mackay DS, Li Z, Yang X, Plagnol V et al. Recessive Mutations in KCNJ13, Encoding an Inwardly Rectifying Potassium Channel Subunit, Cause Leber Congenital Amaurosis. Am J Hum Genet 2011; 89(1):183-190
- 125 Seyffert W. Kapitel 3-5, 7, 12-14, 18-25, In: Seyffert W, (Hrsg.). Lehrbuch der Genetik. 2. Auflage, 2003. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, ISBN: 978-3827410221.
- 126 Silbernagl S, Despopoulos A. Taschenatlas der Physiologie. 6. Auflage, 2003. Thieme, Stuttgart
- 127 Simonelli F, Maguire AM, Testa F, Pierce EA, Mingozzi F, Bennicelli JL et al. Gene therapy for Leber's congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration. Mol Ther 2010; 18(3):643-650
- 128 Sohocki MM, Bowne SJ, Sullivan LS, Blackshaw S, Cepko CL, Payne AM et al. Mutations in a new photoreceptor-pineal gene on 17p cause Leber congenital amaurosis. Nat Genet 2000; 24(1):79-83
- 129 Solbach MC. Mutationsscreening im RD3-Gen bei Patienten mit frühkindlichen und juvenilen Netzhautdegenerationen. Justus-Liebig Universität Gießen, 2014.
- 130 Stieger K, Colle MA, Dubreil L, Mendes-Madeira A, Weber M, Le MG et al. Subretinal delivery of recombinant AAV serotype 8 vector in dogs results in gene transfer to neurons in the brain. Mol Ther 2008; 16(5):916-923
- 131 Stieger K, Lorenz B. Gene therapy for vision loss -- recent developments. Discov Med 2010; 10(54):425-433

## 9. Literaturverzeichnis

- 132 Stieger K, Lorenz B. [Specific Gene Therapy for Hereditary Retinal Dystrophies - An Update.]  
Spezifische Gentherapie bei erblichen Netzhauterkrankungen - ein Update. Klin Monbl Augenheilkd 2013;
- 133 Stieger K, Preising M, Friedburg C, Lorenz B. Gentherapie bei Mutationen im *RPE65*-Gen. Der Augenspiegel 2010;(01):20-21
- 134 Stingl K, Bartz-Schmidt KU, Besch D, Braun A, Bruckmann A, Gekeler F et al. Artificial vision with wirelessly powered subretinal electronic implant alpha-IMS. Proc Biol Sci 2013; 280(1757):20130077
- 135 Strachan T, Read AP.14. Genetic mapping of Mendelian characters. In: Strachan T, Read AP, (Hrsg.). Human Molecular Genetics. 4. Auflage, 2011: 441-465. Garland Sciences, New York, ISBN: 978-0-815-34149-9.
- 136 Strachan T, Read AP.9. Organization of the human genome. In: Strachan T, Read AP, (Hrsg.). Human Molecular Genetics. 4. Auflage, 2011: 255-295. Garland Sciences, New York, ISBN: 978-0-815-34149-9.
- 137 Strachan T, Read AP.13.3. Pathogenic DNA variants. In: Strachan T, Read AP, (Hrsg.). Human Molecular Genetics. 4. Auflage, 2011: 416-428. Garland Sciences, New York, ISBN: 978-0-815-34149-9.
- 138 Strachan T, Read AP.13.1. Types of variation between human genomes. In: Strachan T, Read AP, (Hrsg.). Human Molecular Genetics. 4. Auflage, 2011: 406-411. Garland Sciences, New York, ISBN: 978-0-815-34149-9.
- 139 Sun X, Pawlyk B, Xu X, Liu X, Bulgakov OV, Adamian M et al. Gene therapy with a promoter targeting both rods and cones rescues retinal degeneration caused by AIPL1 mutations. Gene Ther 2010; 17(1):117-131
- 140 Tan MH, Smith AJ, Pawlyk B, Xu X, Liu X, Bainbridge JB et al. Gene therapy for retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis caused by defects in AIPL1: effective rescue of mouse models of partial and complete Aipl1 deficiency using AAV2/2 and AAV2/8 vectors. Hum Mol Genet 2009; 18(12):2099-2114
- 141 Thiadens AA, den Hollander AI, Roosing S, Nabuurs SB, Zekveld-Vroon RC, Collin RW et al. Homozygosity mapping reveals PDE6C mutations in patients with early-onset cone photoreceptor disorders. Am J Hum Genet 2009; 85(2):240-247
- 142 Thompson DA, Li Y, McHenry CL, Carlson TJ, Ding X, Sieving PA et al. Mutations in lecithin retinol acyltransferase (LRAT) cause early-onset severe retinal dystrophy. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001; 42(4):S647
- 143 Traboulsi EI. Genetic Diseases of the Eye. 2. Auflage, 2012. Oxford University Press, New York, ISBN: 978-0-19-532614-7.

## 9. Literaturverzeichnis

- 144 Wang H, den Hollander AI, Moayed Y, Abulimiti A, Li Y, Collin RW et al. Mutations in SPATA7 cause Leber congenital amaurosis and juvenile retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet* 2009; 84(3):380-387
- 145 Wang X, Wang H, Cao M, Li Z, Chen X, Patenia C et al. Whole-exome sequencing identifies ALMS1, IQCB1, CNGA3, and MYO7A mutations in patients with Leber congenital amaurosis. *Hum Mutat* 2011; 32(12):1450-1459
- 146 Weiland JD, Cho AK, Humayun MS. Retinal prostheses: current clinical results and future needs. *Ophthalmology* 2011; 118(11):2227-2237
- 147 Wolf ED, Vainisi SJ, Santos-Anderson R. Rod-cone dysplasia in the collie. *J Am Vet Med Assoc* 1978; 173(10):1331-1333
- 148 Woodford BJ, Liu Y, Fletcher RT, Chader GJ, Farber DB, Santos-Anderson R et al. Cyclic nucleotide metabolism in inherited retinopathy in collies: a biochemical and histochemical study. *Exp Eye Res* 1982; 34(5):703-714
- 149 Yamazaki A, Hayashi F, Tatsumi M, Bitensky MW, George JS. Interactions between the subunits of transducin and cyclic GMP phosphodiesterase in *Rana catesbiana* rod photoreceptors. *J Biol Chem* 1990; 265(20):11539-11548
- 150 Yau KW, Nakatani K. Light-suppressible, cyclic GMP-sensitive conductance in the plasma membrane of a truncated rod outer segment. *Nature* 1985; 317(6034):252-255
- 151 Young RW. Visual cells and the concept of renewal. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1976; 15(9):700-725
- 152 Zhao Y, Hong DH, Pawlyk B, Yue G, Adamian M, Grynberg M et al. The retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)- interacting protein: subserving RPGR function and participating in disk morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(7):3965-3970

### Internet Referenzen

OMIM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>

Retina International Scientific Newsletter: <http://www.retina-international.org/sci-news/>

### **10. Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation**

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

Unterschrift

### **11. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Birgit Lorenz und Herrn PD Dr. rer. medic.

Markus Preising für die Ermöglichung und Themenstellung meiner Dissertation.

Im Besonderen danke ich Herrn PD Dr. rer. medic. Markus Preising für seine stete Hilfsbereitschaft und unermüdliche Unterstützung sowie die vielen molekulargenetischen Erklärungen. Die von ihm organisierten molekulargenetischen ophthalmologischen Seminare in der Klinik waren für das inhaltliche Verständnis meiner Arbeit sehr hilfreich.

Die Arbeit und Forschung auf dem Gebiet der molekularen Ophthalmologie waren für mich sehr lehrreich und spannend.

Ferner danke ich dem ganzen Team des Labors für Molekulare Ophthalmologie, besonders Frau Annabella Janise, die mir jederzeit hilfsbereit bei meinen Laborarbeiten mit Rat und Tat zur Seite stand.

Auch möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie für die vielen aufbauenden, tröstenden und aufmunternden Worte bedanken. An vielen langen Arbeitstagen und Nächten, haben sie mir geholfen, motivationsarme Zeiten zu überwinden und somit zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen.

